



**ANA RAQUEL
FIGUEIRINHAS
CORREIA FERREIRA**

**EFEITO DO TRATAMENTO HIPERBÁRICO NA
HIDRÓLISE DE PASTA KRAFT COM CELULASE**



**ANA RAQUEL
FIGUEIRINHAS
CORREIA FERREIRA**

**EFEITO DO TRATAMENTO HIPERBÁRICO NA
HIDRÓLISE DE PASTA KRAFT COM CELULASE**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão pelo incansável apoio e carinho.

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco

Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Dmitry Victorovich Evtugin

Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Eng. José Luís Amaral

Director de I&D tecnológico do Instituto de Investigação da Floresta e do Papel (RAIZ), Eixo

Agradecimentos

“Leva tempo para alguém ser bem sucedido porque o êxito não é mais do que a recompensa natural pelo tempo gasto em fazer algo direito.”

Joseph Ross

Começaria em primeiro lugar por agradecer aos meus orientadores o professor Doutor Dmitry Victorovich Evtyugin e ao professor Doutor Jorge Saraiva pela oportunidade que me deram em desenvolver este trabalho e por todo o apoio e compreensão demonstrada ao longo da sua elaboração.

Agradeço também ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas condições disponibilizadas para a elaboração deste trabalho. E ainda aos meus colegas de laboratório pelo apoio que me deram, em especial a Andreia Figueiredo, a Sónia Prozil e a Elisabete.

Aos meus amigos Sandra, Pedro, Cátia e Vera agradeço por me aturarem ao longo destes anos.

Ao Mickael agradeço pela ajuda concedida no aparelho de alta pressão.

Agradeço ainda aos meus pais e ao meu irmão pela presença e apoio incondicional.

Para a minha família em geral, agradeço a confiança que sempre demonstraram.

Palavras-chave

Celulose, Hidrólise enzimática, Celulase, Pasta kraft, Processamento a alta pressão

Resumo

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito que o tratamento a alta pressão hidrostática exerce sobre a hidrólise enzimática com celulase de pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. Foi utilizada a *endo* celulase (EC 3.2.1.4) comercial de tipo 1,4-(1,3:1,4)- β -D-glucano 4-glucano- hidrolase produzida pelo fungo *Tricoderma virido*. De modo a averiguar qual a influência que o tratamento hiperbárico tem sobre a velocidade de hidrólise e sobre a quantidade de açúcares redutores formados, quando aplicado previamente à reacção de hidrólise, submeteu-se a pasta a pressões de 300 e 400 MPa durante intervalos de 5, 15 ou 45 minutos.

De uma forma geral, verificou-se que a pressão e o tempo de pressurização representam dois parâmetros que afectam significativamente a extensão da reacção de hidrólise, visto o seu aumento se traduzir numa maior quantidade de açúcares redutores formados. Contudo, apesar de no tratamento hidrostático a 400 MPa se verificar uma maior intensidade de hidrólise do que a 300 MPa, à medida que a pasta está mais tempo sob pressão o seu efeito torna-se cada vez menos acentuado quando comparado com as amostras que foram pressurizadas durante menores intervalos de tempo à mesma pressão. Para posteriores análises, escolheu-se a pasta hidrolisada pré-tratada a 400 MPa durante 15 minutos, onde após 15 minutos do decorrer da reacção, a quantidade de açúcares redutores formados aumentou cerca de 80% face à da pasta não submetida a este tipo de pré-tratamento. Para a mesma pasta, observou-se ainda um aumento da velocidade de hidrólise nos instantes iniciais da reacção na ordem dos 66% relativamente à pasta não tratada. A conjugação destes dois factores leva a que, comparando as pastas pré-tratadas com as não tratadas, se alcance um patamar na produção de açúcares redutores decorrido aproximadamente o mesmo tempo de reacção, mas com uma quantidade de açúcares redutores produzidos mais elevada para a pasta com tratamento hiperbárico.

Observações microscópicas demonstraram que as fibras das pastas processadas a alta pressão se apresentam mais intumescidas e flexíveis, em comparação com a pasta sem efeito de tratamento de alta pressão, provando que o processamento a alta pressão é um método eficaz para aumentar a acessibilidade das fibras celulósicas face à hidrólise enzimática com celulase. Desta forma, é possível degradar maior quantidade de celulose face aos métodos convencionais que não utilizam o processamento hiperbárico como pré-tratamento.

Keywords

Cellulose, Enzymatic hydrolysis, Cellulase, Kraft pulp, High pressure processing

Abstract

In this work was evaluated the effect that high pressure treatment exerts on the enzymatic hydrolysis with cellulase of *Eucalyptus globulus* bleached kraft pulp. It was used a commercial endo cellulase enzyme (EC 3.2.1.4) of type 1, 4 - (1,3:1,4)- β -D-glucan 4-glucan hydrolase produced by the fungus *Tricoderma virido*. In order to study the influence of the hyperbaric treatment over the hydrolysis rate and over the amount of reducing sugars formed, the pulp was subjected to pressures of 300 and 400 MPa during 5, 15 or 45 minutes prior to the hydrolysis reaction.

Overall, it was found that the pressure and pressurization time are two parameters that significantly affect the extent of the hydrolysis reaction, because its increase result in a greater amount of reducing sugars formed. However, despite the treatment at 400 MPa promote a greater intensity of hydrolysis than the treatment at 300 MPa, as long as the pulp is under pressure over time, this effect becomes less pronounced when compared with samples that were pressurized during shorter intervals of time at the same pressure. For further analysis, it was used the sample of hydrolyzed pulp pre-processed at 400 MPa during 15 minutes, where after 15 minutes of hydrolysis, the amount of reducing sugars formed increased approximately 80% compared to the pulp that was not subject to this type of treatment. For the same pulp, there was also an increased rate of hydrolysis during the first minutes of the reaction in the order of 66% compared to the untreated pulp. Comparing the hydrolysis behavior of pre-treated and non-treated pulps, it was seen that the former reaches the maximum rate of hydrolysis approximately at the same time, but with an higher amount of produced reducing sugars.

Microscopic observations showed that the fibers of pulps processed at high pressures are more flexible and swollen compared to the pulp not subjected to the hyperbaric effect, proving that high pressure processing is an effective method to increase the accessibility of cellulosic fibers to the enzymatic hydrolysis with cellulase. Thus, it is possible to degrade more cellulose compared to the conventional methods that do not use high pressure processing as a pre-treatment.

Símbolos e Abreviaturas

Abs	Absorvância
Abs_{cg}	Absorvância corrigida
Act	Actividade
CMC	Carboximetilcelulose
D	Estágio com dióxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
E	Enzima
EG	Endoglucanase
E_p	Estágio com peróxido
ES	Complexo enzima-substrato
E_x	Teor de extractáveis
(G)	Unidades de Guaicilpropano
Galp	Galactopirranose
Glc	Glucose
[Glc]	Concentração de glucose
Glup	Glucopirranose
(H)	Unidades de p-Hidroxifenilpropano
HP	Alta pressão
HPP	Processamento a alta pressão
IUB	União Internacional de Bioquímica
K_m	Constante de Michaelis – Menten
m(Glc)	Massa de glucose
m_{amostra húmida}	Massa da amostra húmida
m_{amostra seca}	Massa da amostra seca
Manp	Manopirranose
m_{balão+esferas}	Massa do conjunto balão+ esferas de vidro
m_{balãoseco+esferas}	Massa do conjunto balão+ esferas de vidro
m_{cadinho}	Massa do cadinho
m_{cadinho+cinza}	Massa do conjunto cadinho + cinza

m_{cartucho}	Massa do cartucho
m_{cartucho+pasta}	Massa do conjunto cartucho + pasta
m_{cinza}	Massa de cinzas
m_{copo}	Massa do copo de vidro
m_{copo+pasta}	Massa do conjunto copo + pasta
m_{copo+pasta seca}	Massa do conjunto copo + pasta seca
m_{extractáveis}	Massa de extractáveis
m_{monossacarídeos}	Massa de monossacarídeos
m_{pasta seca}	Massa da pasta seca
mt_{monossacarídeos}	Massa total de monossacarídeos
n(Glc)	Número de moles de glucose
P	Produto
S	Substrato
(S)	Unidades de Seringilpropano
T	Tempo
UV	Ultra violeta
V	Volume
W	Teor de humidade
WRV	Capacidade de absorção de água
Xylp	Xilopiranose
Z	Teor de cinzas

Índice

Símbolos e Abreviaturas	XIII
Índice.....	XV
Índice de Figuras.....	XIX
Índice de Tabelas	XXI
Introdução.....	Erro! Marcador não definido.
Capítulo I Revisão Bibliográfica.....	Erro! Marcador não definido.
1 A importância da indústria papelreira no panorama nacional	Erro! Marcador não definido.
1.1 Composição química da madeira.....	Erro! Marcador não definido.
1.1.1 Estrutura morfológica da fibra celulósica	Erro! Marcador não definido.
1.1.2 Estrutura morfológica da fibra celulósica	Erro! Marcador não definido.
1.1.3 Celulose.....	Erro! Marcador não definido.
1.1.4 Hemiceluloses.....	Erro! Marcador não definido.
1.1.5 Lenhina.....	Erro! Marcador não definido.
1.1.6 Componentes extractáveis.....	Erro! Marcador não definido.
1.2 Intumescimento e a sua relação com a celulose e as hemiceluloses	Erro! Marcador não definido.
1.3 Da madeira ao papel.....	Erro! Marcador não definido.
1.3.1 Processo de cozimento das pastas	Erro! Marcador não definido.
1.3.1.1 Processo kraft	Erro! Marcador não definido.
1.3.1.2 Reacções dos polissacarídeos.....	Erro! Marcador não definido.
1.4 Enzimas	Erro! Marcador não definido.
1.4.1 Classificação e Nomenclatura das enzimas....	Erro! Marcador não definido.
1.4.2 Actividade enzimática.....	Erro! Marcador não definido.

1.5	Aplicação das enzimas na indústria de pasta e papel.	Erro! Marcador não definido.
1.6	Celulases.....	Erro! Marcador não definido.
1.6.1	Classificação de Celulases	Erro! Marcador não definido.
1.7	Microrganismos envolvidos na degradação da celulose	Erro! Marcador não definido.
1.7.1	Produção de celulases por bactérias e fungos	Erro! Marcador não definido.
1.8	Problemas relacionados com aplicação de enzimas nos materiais lenhocelulosicos.....	Erro! Marcador não definido.
1.9	Processamento a alta pressão.....	Erro! Marcador não definido.
1.9.1	Sistema de alta pressão	Erro! Marcador não definido.
1.9.2	Princípios do método de alta pressão hidrostática (HPP)	Erro! Marcador não definido.
1.9.3	Método de alta pressão e fenómeno de hornificação	Erro! Marcador não definido.
Capítulo II	Materiais e Métodos.....	Erro! Marcador não definido.
2.1	Caracterização da pasta de <i>Eucalyptus globulus</i>	Erro! Marcador não definido.
2.1.1	Determinação do teor de humidade	Erro! Marcador não definido.
2.1.2	Determinação do teor de cinzas.....	Erro! Marcador não definido.
2.1.3	Determinação do teor de extractáveis em acetona.....	Erro! Marcador não definido.
2.1.4	Determinação do teor de açúcares neutros.....	Erro! Marcador não definido.
2.2	Determinação da recta de calibração da glucose a partir do método de DNS	Erro! Marcador não definido.
2.3	Características da enzima utilizada - celulase	Erro! Marcador não definido.
2.4	Optimização das condições de hidrólise enzimática da celulase utilizando como substrato artificial CMC	Erro! Marcador não definido.

2.4.1	Solução de CMC 1% (wt) utilizada como substrato.....	Erro! Marcador não definido.
2.4.2	Determinação da actividade enzimática da celulase em CMC.....	Erro! Marcador não definido.
2.5	Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	Erro! Marcador não definido.
2.5.1	Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> sem pré-tratamento de alta pressão	Erro! Marcador não definido.
2.5.2	Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> com pré-tratamento de alta pressão	Erro! Marcador não definido.
2.6	Sistema sinérgico entre a xilanase e a celulase na hidrólise de celulose de pasta kraft pré-tratada a alta pressão.....	Erro! Marcador não definido.
2.6.1	Hidrólise enzimática sequencial das pastas kraft (xilanase seguida de celulase) com pré-tratamento de alta pressão.....	Erro! Marcador não definido.
Capítulo III	Resultados e Discussão.....	Erro! Marcador não definido.
3.1	Composição química da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	Erro! Marcador não definido.
3.2	Estudo da hidrólise enzimática da CMC com celulase	Erro! Marcador não definido.
3.3	Hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i> pela celulase	Erro! Marcador não definido.
3.3.1	Estudo da influência da alta pressão na hidrólise enzimática	Erro! Marcador não definido.
3.4	Análise de imagens de fibras em suspensão	Erro! Marcador não definido.
3.5	Caracterização e quantificação dos açúcares neutros da pasta kraft hidrolisada	Erro! Marcador não definido.
3.6	Estudo do complexo sinérgico entre xilanase e celulase na hidrólise enzimática da pasta kraft de <i>Eucalyptus globulus</i>	Erro! Marcador não definido.
Capítulo IV	Conclusão	Erro! Marcador não definido.

Bibliografia.....	Erro! Marcador não definido.
Anexo	Erro! Marcador não definido.
Anexo A – Tabelas auxiliares.....	Erro! Marcador não definido.
Anexo B – Gráficos auxiliares.....	Erro! Marcador não definido.
Anexo C – Metodologia de tratamento dos resultados experimentais	Erro! Marcador não definido.

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema simplificado da ultraestrutura da parede celular de uma fibra adulta	Erro! Marcador não definido.
Figura 2- Representação esquemática da organização gradual da celulose na parede da fibra da Madeira.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 3- Estrutura da celulose ^{adptado}	Erro! Marcador não definido.
Figura 4- Estrutura da celulose demonstrando as ligações por pontes de hidrogénio inter e intramoleculares.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 5- A) Célula unitária da Celulose I e B) Respetivos planos.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 6- Fórmulas dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 7- Intumescimento da fibra de celulose.	Erro! Marcador não definido.
Figura 8- Principais tipos de processos para a produção de pastas.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 9- Complexo enzima – substrato	Erro! Marcador não definido.
Figura 10- Esquema do modelo de encaixe induzido	Erro! Marcador não definido.
Figura 11- Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reacção catalisada enzimaticamente.	Erro! Marcador não definido.
Figura 12- Representação da estrutura cristalográfica de uma celulase, produzida por <i>Trichoderma reesei</i>	Erro! Marcador não definido.
Figura 13- Mecanismo de degradação enzimático – sinergia entre endo- e exo-glucanases	Erro! Marcador não definido.
Figura 14- Representação esquemática do princípio isostático do processamento por alta pressão ^{adaptado}	Erro! Marcador não definido.
Figura 15- Mecanismo de agregação das microfibrilas durante a secagem.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 16- Representação do fenómeno de cocrystalização da celulose.....	Erro! Marcador não definido.

Figura 17- Representação do fenómeno de recristalização da celulose ^{adaptado} **Erro! Marcador não definido.**

Figura 18- Montagem Experimental do extractor tipo Soxhlet.**Erro! Marcador não definido.**

Figura 19- Esquema do método de DNS..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 20- Equipamento High Pressure U33 **Erro! Marcador não definido.**

Figura 21-Quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo da hidrólise enzimática da CMC com celulase..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 22- Actividade enzimática da celulase em CMC ao longo do tempo de hidrólise. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 23- Quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo da hidrólise enzimática da pasta kraft com celulase **Erro! Marcador não definido.**

Figura 24- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados para quatro amostras de pasta kraft. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 25- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados em função das duas concentrações de enzima utilizadas. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 26- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo para as amostras que foram sujeitas a uma pressão 300 MPa e para a pasta não pressurizada. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 27- Actividade enzimática da celulase na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de reacção para a pressão de 300 MPa..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 28- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo para as amostras que foram sujeitas a uma pressão 400 MPa e para a pasta não pressurizada. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 29- Actividade enzimática da celulase na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de reacção para a pressão de 400 MPa..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 30- Percentagem da variação dos açúcares redutores formados, para as diferentes pressões e para os diferentes tempos de residência em que as pastas estiveram sujeitas ao efeito de alta pressão ao longo do tempo da reacção enzimática**Erro! Marcador não definido.**

Figura 31- Percentagem da variação dos açúcares redutores formados, para a pressão de 400 MPa e para os diferentes tempos de residência a que as pastas foram submetidas a essa pressão, ao longo do tempo da reacção enzimática **Erro! Marcador não definido.**

Figura 32- Representação esquemática do comportamento das microfibrilas de celulose quando sujeitas a um tratamento de alta pressão. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 33- Fotografias da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* (observação microscópica com uma ampliação de 20x): (a) pasta sem tratamento de alta pressão, (b) pasta tratada a 300 MPa, durante 45 minutos, (c) pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos, (d) pasta tratada a 400 MPa durante 45 minutos..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 34- Fotografias da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* (observação microscopia com a ampliação de 40x): (a) pasta hidrolisada mas sem tratamento de alta pressão, (b) pasta hidrolisada e tratada a 400 MPa durante 15 minutos.. **Erro! Marcador não definido.**

Figura 35- Resultados obtidos dos açúcares redutores formados ao longo do tempo do complexo sinérgico em comparação com a pasta com e sem tratamento hiperbárico hidrolisada pela celulase..... **Erro! Marcador não definido.**

Índice de Tabelas

Tabela 1- Componentes majoritários das hemiceluloses^a ... **Erro! Marcador não definido.**

Tabela 2- Tipos e abundâncias de cada precursor na madeira de resinosas e de folhosas.**Erro! Marcador não definido.**

Tabela 3- Terminologia associada ao cozimento kraft **Erro! Marcador não definido.**

Tabela 4- Nomenclatura e classificação de enzimas..... **Erro! Marcador não definido.**

Tabela 5- Características principais do equipamento de High Pressure U33.**Erro! Marcador não definido.**

Tabela 6- Tratamento que as pastas sofreram sobre o efeito de alta pressão**Erro! Marcador não definido.**

Tabela 7- Composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* branqueada (% de matéria seca) **Erro! Marcador não definido.**

Tabela 8- Características dos ensaios da hidrólise enzimática**Erro! Marcador não definido.**

Tabela 9- Quantidade de açúcares redutores obtidos aos 90 minutos da reacção enzimática..... **Erro! Marcador não definido.**

Tabela 10- Composição média em monossacarídeos da pasta kraft**Erro! Marcador não definido.**

Tabela 11- Composição média em monossacarídeos da pasta kraft após a combinação da xilanase com a celulase..... **Erro! Marcador não definido.**

Introdução

O uso de celulasas na indústria papelreira é um tema que tem vindo a ganhar importância ao longo dos últimos anos e que tem vindo a provar ser um método com capacidade para promover a redução da energia de refinação de pastas e modificar as propriedades superficiais das fibras celulósicas. Estudos efectuados demonstram ainda que o tratamento de pastas celulósicas secas com celulasas provoca o aumento da sua capacidade de ligação, melhorando algumas das propriedades papelreiras.

O facto da pasta de papel ser constituída na sua grande maioria por celulose, o polissacarídeo renovável mais abundante na Natureza, transforma-a numa importante matéria-prima para as indústrias que produzem materiais celulósicos. Desta forma, a hidrólise enzimática de pastas com celulasas permite isolar celulose que pode posteriormente vir a ser usada em reacções de modificação química ou na produção de celulose microcristalina. Na actualidade em que vivemos, onde a escassez dos recursos fósseis põe em causa a sustentabilidade energética, a hidrólise enzimática de celulose em açúcares fermentáveis para a produção de etanol constitui uma área da biorefinação extensamente estudada. O bioetanol produzido é renovável e amigo do ambiente, no entanto o seu processo de produção ainda é economicamente inviável. Para além dos elevados custos associados às enzimas, é necessário ultrapassar as dificuldades que a estrutura altamente organizada da celulose oferece face à hidrólise química ou enzimática.

Estudos efectuados [1] demonstraram que o tratamento hiperbárico de pastas celulósicas previamente a uma reacção de hidrólise com ácido sulfúrico diluído promove uma maior degradação da fracção de celulose amorfa face à da pasta não processada, devido ao aumento da sua acessibilidade. [2] verificaram ainda que sob pressão a actividade da enzima celulase aumenta. Tendo por base este conhecimento, com este trabalho pretendeu-se estudar qual a influência que o processamento a altas pressões hidrostáticas exerce sobre a hidrólise enzimática de pastas kraft de *Eucalyptus globulus* com celulasas.

Capítulo I Revisão Bibliográfica

1 A importância da indústria papelreira no panorama nacional

A indústria papelreira é um sector estratégico para a economia nacional, representando o 4º ramo exportador líquido, depois das indústrias têxtil, do couro e das madeiras [3]. Actualmente a indústria de pasta e papel contribui positivamente para o PIB industrial, tendo condições objectivas de crescimento e expansão da sua actividade. O seu valor estratégico é ainda acrescido pelo facto de se tratar de uma actividade baseada na transformação da madeira numa matéria-prima nacional, natural e renovável, e cujos produtos são eles próprios naturais, renováveis, reutilizáveis e recicláveis [3].

As matérias-primas mais utilizadas no fabrico de pasta celulósica são essencialmente madeiras de resinosas e folhosas, sendo a espécie mais utilizada em Portugal o *Eucalyptus globulus* [4]. A variedade *E. globulus* é de crescimento rápido e encontrou no país condições privilegiadas ao seu desenvolvimento, adaptando-se com facilidade ao clima e aos solos e ganhando uma expressão económica crescente [4-5]. Na actualidade, Portugal é o maior produtor mundial de pasta kraft branqueada obtida a partir desta madeira, sendo cerca de 40% desta pasta utilizada em fábricas integradas de pasta e papel nacionais [5].

A importância desta indústria face ao panorama descrito, faz da pasta de papel uma matéria-prima com elevado potencial e que cada vez mais é alvo de estudos para desenvolvimento de novas aplicações.

1.1 Composição química da madeira

A madeira é um material heterogéneo composto essencialmente por fibras, cuja composição química não se define com exactidão para a mesma espécie de árvores, pois varia com diferentes factores, nomeadamente com a idade, com a localização geográfica, com as condições do solo, com tipo de madeira e com parte da árvore (raiz, caule e folhas), etc. Contudo, e dependendo da espécie, a madeira possui uma parede celular formada por

cerca de 40-50% de fibrilas de celulose, embebidas numa matriz de hemiceluloses (20-35%) e lenhina (20-30%). Existem ainda mas em menor quantidade compostos de baixo peso molecular, geralmente designados por extractáveis (1-5%) e cinzas (<1%) [6].

1.1.1 Estrutura morfológica da fibra celulósica

A nível microscópico a parede celular de uma fibra é constituída por uma parede primária de espessura fina entre 0,1 μm e 0,2 μm , sendo formada por celulose, hemicelulose e pectina completamente envolvidos numa matriz de lenhina. No interior da parede primária verifica-se a formação de uma parede secundária, apresentando um espessamento significativo de 1-10 μm , esta parede encontra-se dividida em três subcamadas, a camada externa S1, a camada intermédia S2 e a camada interna S3. A parede secundária é constituída essencialmente por microfibrilas de celulose de orientação aleatórias ao que conferem a flexibilidade e a consistência da parede secundária, esta parede é ainda constituída por hemiceluloses e lenhina. Entre as células pode-se encontrar uma região altamente lenhificada, a lamela média, que opera como o elemento aglutinador das fibras. No interior da parede secundária observa-se ainda a formação de uma camada interna designada por camada verrugosa como apresenta a Figura 1 [7-10].

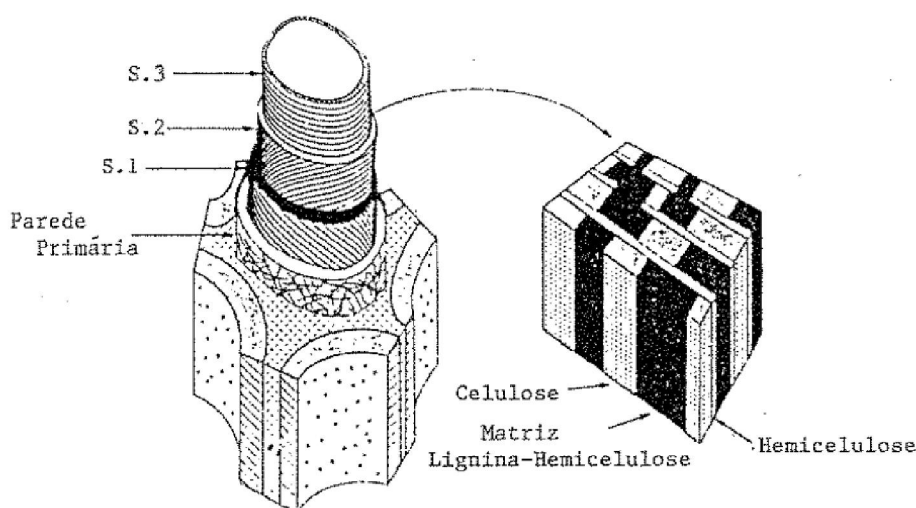


Figura 1- Esquema simplificado da ultraestrutura da parede celular de uma fibra adulta

1.1.2 Estrutura morfológica da fibra celulósica

Na parede celular da madeira, as cadeias de moléculas de celulose encontram-se associadas sobre a forma de microfibrilas, estruturas lineares extremamente resistentes, apresentando regiões altamente organizadas (cristalinas) que são interrompidas por zonas menos ordenadas (amorfas), esta sequência constitui as diferentes camadas da parede celular, como se demonstra na Figura 2^[11] [12].

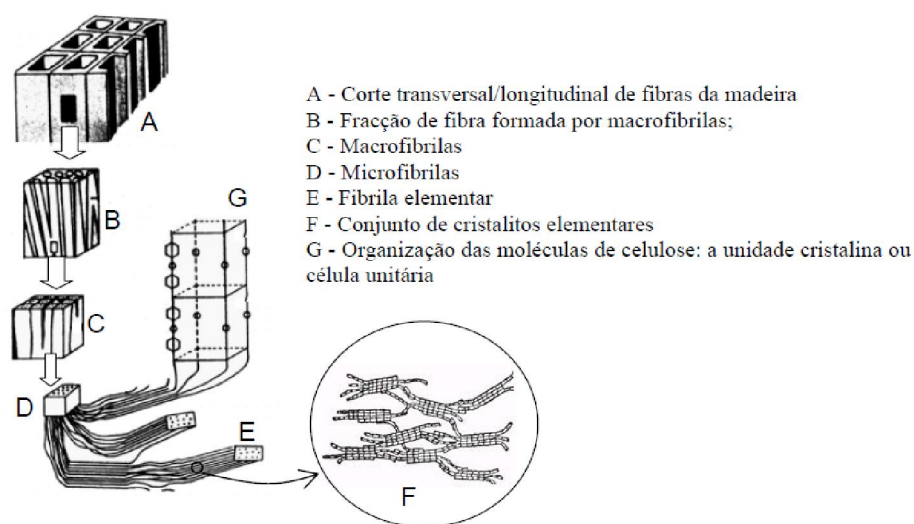


Figura 2- Representação esquemática da organização gradual da celulose na parede da fibra da Madeira

1.1.3 Celulose

A celulose é o constituinte maioritário tanto de madeira de resinosas como de folhosas correspondendo a cerca de 40-50% da matéria seca da madeira, encontrando-se predominantemente na parede secundária. Trata-se de um homopolímero linear constituído por unidades de D-anidro-glucopirranose, estando ligadas entre si, por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ como ilustra a Figura 3. A configuração de β -D-glucopirranose só é possível pela rotação de 180° da molécula seguinte, em relação à posição C_1-C_4 , com o resultado dessa ligação, a unidade estrutural que se repete da macromolécula de celulose, origina-se o dímero celobiose [13-15].

Os anéis de glucopirranose adoptam a conformação de cadeia 4C_1 e os grupos substituintes, o grupo hidroxilo dos carbonos 2 e 3 e o grupo hidroximetilo (CH_2OH) do carbono 5, encontram-se orientados pelos planos equatoriais [13-16].

Cada cadeia de celulose possui grupos terminais com diferentes reactividades, sendo que o grupo terminal redutor, contém uma extremidade com o grupo hidroxilo em C-1 livre em equilíbrio com a estrutura de aldeído e o não redutor contém o grupo hidroxilo em C-1 envolvido na ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ [13-15].

O grau de polimerização de uma cadeia de celulose é determinado pelo número de unidades de anidrogucose ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$, sendo $162 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ a massa molecular de cada unidade), unidas entre si pelas ligações glicosídicas. Este grau de polimerização na cadeia de celulose proveniente da madeira pode ser da ordem das dezenas de milhar (compreendendo-se entre 4000 e 10000) [13-14].

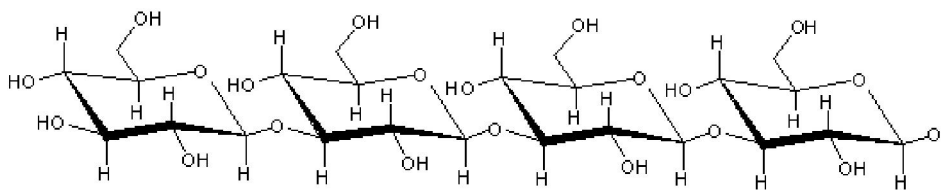


Figura 3- Estrutura da celulose ^{adptado}

A celulose tem forte tendência a estabelecer pontes de hidrogénio intra e intermolecular entre os grupos da mesma cadeia, como se pode visualizar na Figura 4^[13]. As pontes intermoleculares são responsáveis pela cristalinidade da celulose, fixando-se desta forma entre os grupos hidroxilo em C-6 de uma unidade de glucose e o C-2 da unidade contígua e ainda entre o grupo hidroxilo em C-3 e o oxigénio piranosídico do anel contíguo. Entre cadeias as pontes de hidrogénio têm propensão a formar-se através dos grupos hidroxilo C-3 e C-6. Em relação às pontes intramoleculares, estas conferem a rigidez da cadeia [13-14].

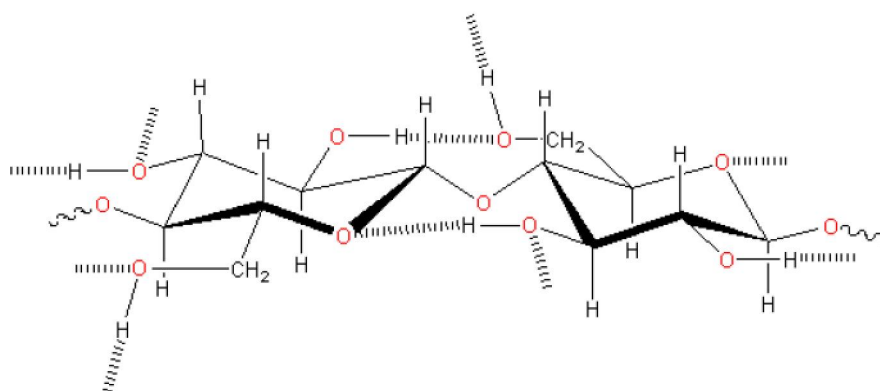


Figura 4- Estrutura da celulose demonstrando as ligações por pontes de hidrogénio inter e intramoleculares.

Dado o seu elevado grau de polimerização, bem com a sua distinta organização supramolecular, a celulose apresenta uma insolubilidade à maioria dos solventes orgânicos, diminuindo também a sua reactividade. Sendo igualmente responsável tanto na madeira como nas fibras de pastas pela rigidez, densidade e outras propriedades mecânicas [11].

Devido à estrutura cristalina da celulose, este foi o primeiro polímero a ser estudado através de técnicas de análise de raios-X. A celulose nativa denominada por celulose I em termos cristalográficos, pode ser descrita como um modelo de célula unitária monoclinica na qual têm cadeias de celulose orientadas paralelamente, como evidencia a Figura 5^[12] [12].

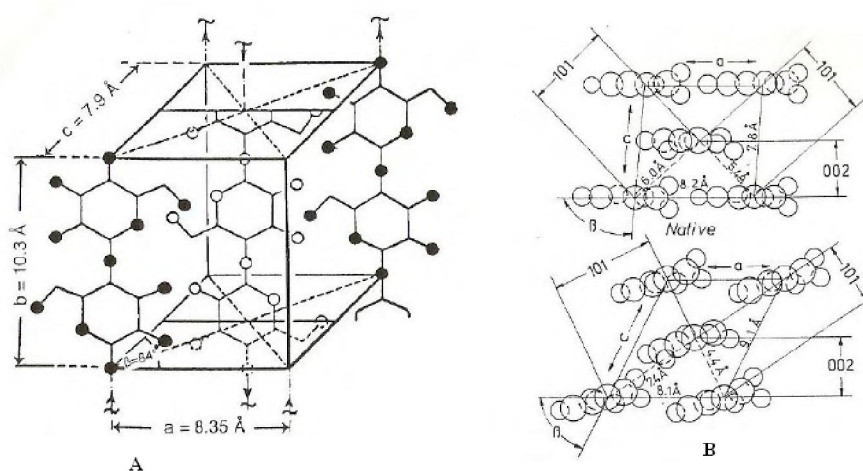


Figura 5- A) Célula unitária da Celulose I e B) Respectivos planos

A celulose I por ter uma estrutura cristalina termodinamicamente menos estável pode adoptar outras estruturas polimórficas (celulose II, III e IV). Em relação à celulose II, isto é celulose regenerada, esta encontra-se ligada por pontes de hidrogénio entre os planos contíguos e no mesmo plano, sendo que é a estrutura termodinamicamente mais estável, pelo que a passagem de celulose I à celulose II é praticamente irreversível. A celulose II tem um arranjo anti-paralelo, em relação a celulose nativa [17-18].

No caso da celulose III, esta será adquirida quando a celulose I ou II forem tratadas a temperaturas abaixo dos -30°C com uma solução de amónia, monometilamina ou nonoetilamina e sendo recristalizada depois. Já a celulose IV é obtida através de um tratamento de glicerina a altas temperaturas e sobre o efeito de pressão da celulose I ou II.

Sendo importante o grau de cristalinidade definiu-se um que dê a proporção mássica da fase cristalina face ao total. A percentagem de cristalinidade da celulose é de 65-75% nas pastas e a cristalinidade da celulose nativa é de 50-65% [18-19].

1.1.4 Hemiceluloses

As hemiceluloses são um heteropolissacarídeo composto por diversas unidades de monossacarídeos, estas apresentam uma estrutura amorfa com cadeias curtas e ramificadas, cuja funcionalidade é essencialmente de suporte. As hemiceluloses ostentam um grau de polimerização relativamente baixo, variando em relação ao tipo de madeira, no caso de madeira de folhosas, esta apresenta um grau de polimerização de cerca de 200, já na madeira de resinosas este grau é inferior sendo de cerca de 100 [20-23].

Devido a fácil hidrolisação em meio ácido destes polissacarídeos, os componentes monoméricos principais resultantes são as hexoses (β -D-glucose, β -D-manose, ou α -D-galactose), pentoses (β -D-xilose ou α -L-arabinose), e ainda em outros componentes residuais nomeadamente os ácidos urónicos (ácidos β -D-glucurónico, α -D-4-O-metilglucurónico e α -D-galacturónico) de desoxi-hexoses (α -L-ramnose) e de grupos acetilo, como se ilustra na Figura 6^[22] [20-23].

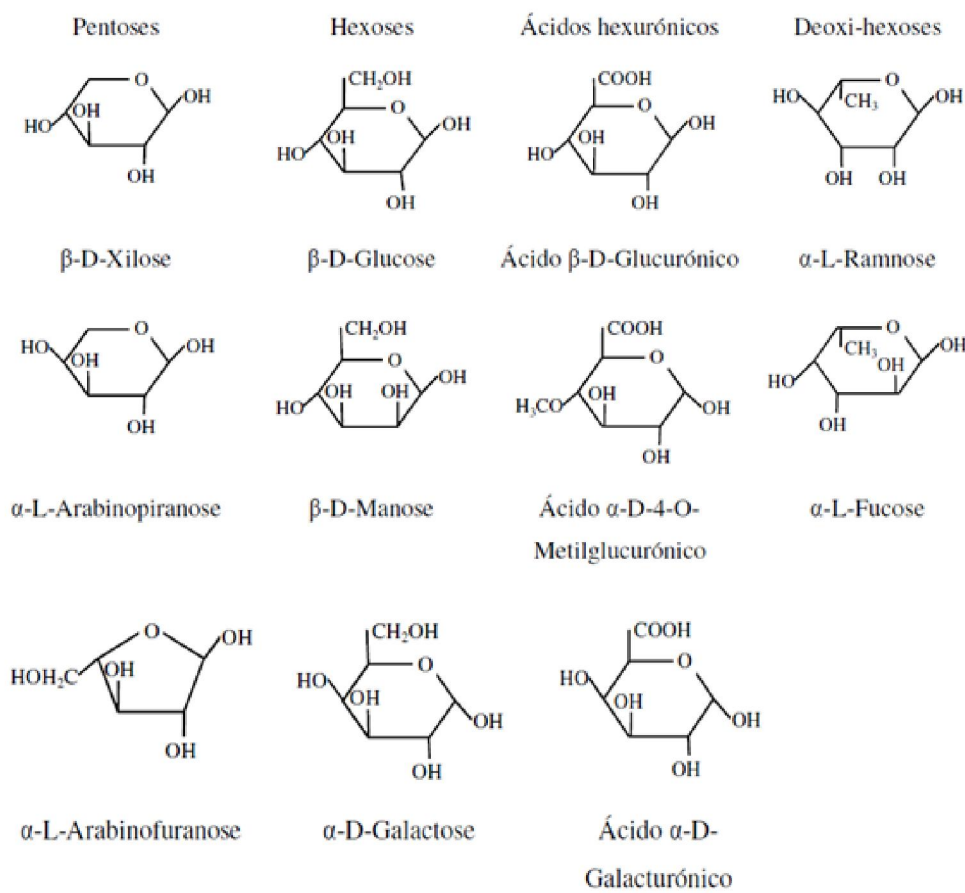


Figura 6- Fórmulas dos monossacarídeos constituintes das hemiceluloses

As hemiceluloses podem ser divididas em quatro grandes grupos mediante a unidade da cadeia principal, isto é, as xilanas, as mananas, as xiloglucanas e as glucanas [20-23].

Pela análise da Tabela 1, averigua-se que a nível das hemiceluloses existem diferenças entre a madeira de folhosas em relação à madeira de resinosas, sendo que no caso das folhosas estas são constituídas maioritariamente por glucuronoxilanas e no caso das resinosas estas são compostas predominantemente por galactoglucomananas [24].

Tabela 1- Componentes maioritários das hemiceluloses.[7]^a

Tipo de Hemicelulose	Ocorrência	Quantidade (% na madeira)	Composição		
			Monómeros	Razão molar	Ligação
Galactoglucomanana	Resinosas	5-8	β -D-Manp	3	1 \rightarrow 4
			β -D-Glup	1	1 \rightarrow 4
			α -D-Galp	1	1 \rightarrow 6
			Acetilo	1	
Arabinoglucorono-xilana	Resinosas	7-10	β -D-Xylp	10	1 \rightarrow 4
			4-O-Me- α -GlupA	2	1 \rightarrow 2
			α -L-Araf	1.3	1 \rightarrow 3
			β -D-Xylp	10	1 \rightarrow 4
Glucoronoxilana	Folhosas	15-30	4-O-Me- α -GlupA	1	1 \rightarrow 2
			Acetilo	7	
Glucomanana	Folhosas	2-5	β -D-Manp	1-2	1 \rightarrow 4
			β -D-Glup	1	1 \rightarrow 4

^a Todos os valores estão referidos em percentagem em relação a massa de madeira seca.

1.1.5 Lenhina

A lenhina é um heteropolímero aromático com uma estrutura macromolecular, amorfa, altamente ramificada, sendo constituída por unidades derivadas de fenilpropano, ligadas entre si maioritariamente pelas ligações éter e ainda pelas ligações carbono – carbono [25-26].

Esta pode ser descrita como um material polifenólico, proveniente da polimerização dos seus três precursores designadamente pelos álcoois cinâmicos, isto é, o álcool *p*-cumarílico que são unidades de *p*-diroxifenilpropano (H), o álcool coniferílico que são unidades de guaiacilpropano (G) e o álcool sinapílico que são unidades de siringilpropano (S). Estas unidades não se encontram igualmente distribuídas nas árvores folhosas e resinosas, sendo que a lenhina no caso das folhosas é constituída predominantemente pelo

álcool sinapílico, já no caso das resinosas a lenhina provem do álcool cumarílico e do álcool coniferílico, sendo este último, o mais relevante. O álcool cumarílico é o precursor que menos contribui para a estrutura da lenhina tanto nas resinosas como nas folhosas [25, 27-29].

Como ilustra a Tabela 2 tanto na madeira de resinosas como de folhosas as ligações mais abundantes são as ligações β -O-4, mas as ligações dominantes nas lenhinas são as α -aryl éter (em unidades fenólicas) e as ligações β -aryl éter (em unidades fenólicas e não fenólicas), sendo que a degradação da lenhina no licor de cozimento se dá a partir da quebra destas ultimas ligações [25, 28, 30-31].

Tabela 2- Tipos e abundâncias de cada precursor na madeira de resinosas e de folhosas[26, 28, 30-31].

Tipos de ligação	Resinosas	Folhosas
β -O-4	45-50	50-60
α -O-4	6-8	6-8
β -5	9-15	4-6
β -1	2-3	5-15
5-5	10-11	2-5
4-O-5	2-4	2-3
β - β	2-4	3-7

1.1.6 Componentes extractáveis

Os extractáveis são componentes de baixo peso molecular representando 1-5% do peso da madeira, podendo ser removidos em água ou em solventes orgânicos neutros. Estes podem ser qualificados em vários grupos, mediante as características estruturais de cada composto, isto é, podem ser divididos em grandes famílias como os compostos fenólicos, terpénicos e lípidos [7].

1.2 Intumescimento e a sua relação com a celulose e as hemiceluloses

O intumescimento das fibras baseia-se no aumento da área da fibra como ilustra a Figura 7^[32]. Este fenómeno é causado por diversos factores, nomeadamente, pela diferença de pH, diferença de pressão osmótica e pela diferença da concentração de metais [32].

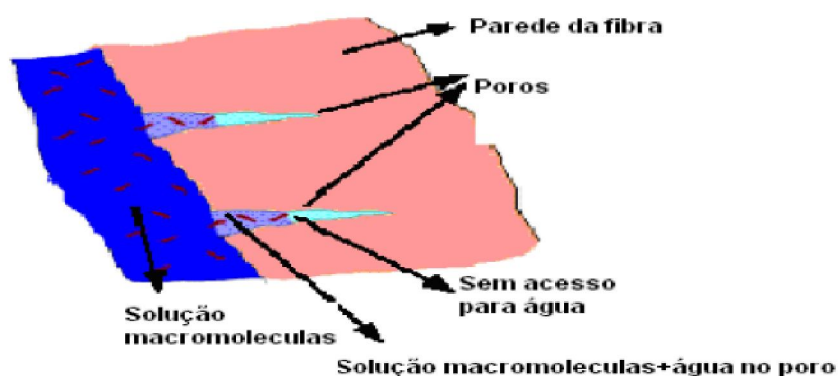


Figura 7- Intumescimento da fibra de celulose.

Existem outros factores que influenciam o intumescimento das fibras, estando estes relacionados com o processo de obtenção das pastas, isto é, a qualidade das fibras, o grau de refinação e o tipo de reagentes usados no branqueamento das pastas [32].

O processo de intumescimento da fibra relaciona-se com a capacidade desta efectuar ligações com as moléculas de água contidas nas pastas celulósicas. Pois as moléculas de água são polares e apresentam elevada afinidade com as hemiceluloses, uma vez que também são polares, logo o melhor intumescimento da fibra é proporcionado pelos reagentes que estimulem menor degradação das hemiceluloses [32].

1.3 Da madeira ao papel

1.3.1 Processo de cozimento das pastas

O principal objectivo das indústrias de papel é a transformação de madeira em pasta celulósica para a produção de papel. Considerando que as pastas celulósicas podem ser classificadas mediante o tipo de cozimento ou obtenção desta, visto existirem vários processos mecânicos ou químicos e ainda mistos que podem ser usados para a separação das fibras celulósicas e na remoção da lenhina [7, 33].

A Figura 8^[32] ilustra os diversos processos usados para a aquisição de pastas celulósicas.

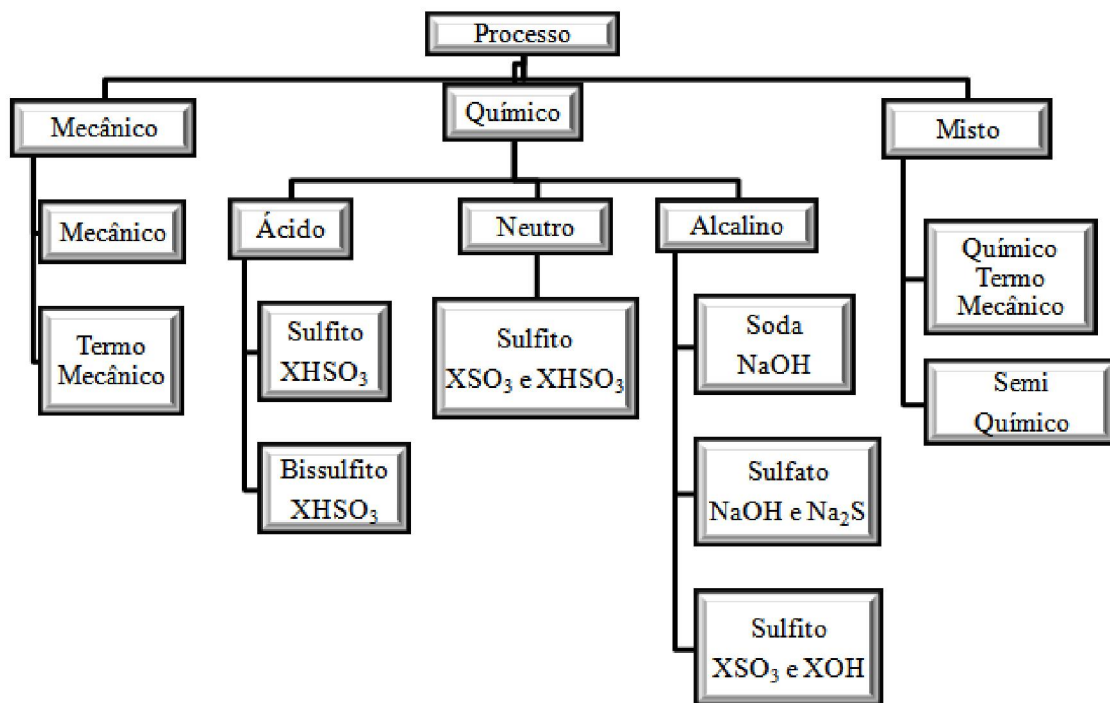


Figura 8- Principais tipos de processos para a produção de pastas

Como se pode verificar as pastas podem ser separadas por classes, mediante o processo de separação das fibras e pelo rendimento obtido. Sendo que as pastas mecânicas têm rendimentos entre 93-97%, a nível das pastas químicomecânicas estas apresentam um

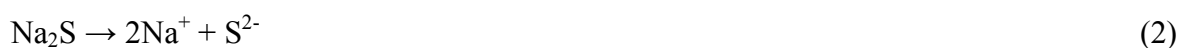
rendimento de 85-95%, já as semiquímicas entre os 70-80% e as pastas químicas um rendimento por volta dos 50% [7, 33].

Apesar do baixo rendimento das pastas químicas, este é o processo mais recorrente a nível industrial, sendo que cerca de 85-90% das pastas obtidas industrialmente são determinadas pelo processo de sulfato ou kraft e os restantes 10-15% pelo processo de Sulfito [7, 33].

1.3.1.1 Processo kraft

O processo kraft, também designado como processo de sulfato, é o processo de primazia para a produção de pasta química para papel. Em relação aos diversos processos químicos este apresenta vantagens, visto poder ser aplicado a uma enorme variedade de madeiras, conseguindo preservar as propriedades das fibras da madeira, apresentando tempos de cozimento menores e conseguindo recuperar posteriormente os reagentes químicos utilizados. Os papéis obtidos por este processo apresentam resistências físico - mecânicas melhores em relação a outros processos de obtenção de pastas [34].

O processo de kraft consiste no cozimento das aparas em meio alcalino, onde o licor de cozimento inicial também designado por licor branco ou lixívia branca é constituído por uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) e por sulfureto de sódio (Na₂S). Os reagentes activos neste licor são os iões OH⁻ e HS⁻ que são determinados através das seguintes reacções químicas [33].



A cinética de remoção da lenhina e as reacções inerentes aos polissacarídeos, são determinados pela concentração dos iões de hidróxido e de hidrogenossulfureto. Ao mesmo tempo que os iões de sulfureto aceleram a deslenhificação, diminuem a degradação dos polissacarídeos e aumentam a qualidade das pastas [35].

A Tabela 3 demonstra os parâmetros principais a controlar no licor de cozimento. O controlo destes parâmetros tem uma função importante no cozimento, uma vez que poderá influenciar o grau de deslenhificação obtido no final bem como a qualidade da pasta obtida [35].

Tabela 3- Terminologia associada ao cozimento kraft [35]

Termo	Definição
Alcalinidade total (g Na ₂ O/L)	[NaOH]+[Na ₂ S]+[Na ₂ CO ₃]
Alcalinidade activa (g Na ₂ O/L)	[NaOH]+[Na ₂ S]
Alcalinidade efectiva (g Na ₂ O/L)	[NaOH]+1/2[Na ₂ S]
Actividade (%)	Alcalinidade activa /Alcalinidade total *100
Índice de sulfureto (%)	[Na ₂ S]/([NaOH]+[Na ₂ S])*100

1.3.1.2 Reacções dos polissacarídeos

A celulose e as hemiceluloses desempenham um papel fundamental no rendimento e nas propriedades papeleiras, visto serem os constituintes principais da pasta. [36-38]

Durante o cozimento de kraft a reactividade dos polissacarídeos depende da estrutura molecular e supramolecular, da acessibilidade que o licor tem ao interior das aparas e ainda das condições do meio de reacção, isto é, da temperatura, da concentração das espécies reactivas e do pH [36-38].

No caso da celulose, esta é bastante mais resistente devido à sua baixa reactividade e à sua elevada insolubilidade, que está relacionada com o seu grau de cristalinidade. O cozimento de kraft favorece a remoção das zonas amorfas bem como a reorganização da sua estrutura, o que provoca o aumento da cristalinidade [36-38].

As principais reacções dos polissacarídeos que ocorrem durante o cozimento de kraft são a hidrólise dos grupos acetilo no início do cozimento o que provoca o *peeling* primário, que consiste na perda do grupo terminal da cadeia do polissacarídeo. Na presença de altas temperaturas e através da hidrólise alcalina ocorre a clivagem aleatória das ligações glicosídicas, ficando as novas cadeias com grupos terminais susceptíveis de

sofrerem um *peeling* secundário. A outra reacção que ocorre nos polissacarídeos durante o cozimento e em competição com o *peeling* é a reacção de *stopping*, isto é, reacção de estabilização do polissacarídeo [36-38].

Estas reacções são de uma elevada importância uma vez que diminuem o tamanho dos hidratos de carbono, tornando-os solúveis [36-38].

1.4 Enzimas

As enzimas são de natureza proteica e actuam como catalisadores biológicos extremamente eficientes, aumentando a velocidade das reacções químicas, não participando nelas como reagentes ou produtos [39].

Quimicamente as enzimas são proteínas, que por sua vez são constituídas por longas cadeias de aminoácidos. Estes aminoácidos estão unidos entre si por ligações peptídicas entre o grupo α -amino de um aminoácido e o grupo α -carboxílico do aminoácido contíguo [39].

As proteínas apresentam uma estrutura tridimensional, que lhe é conferida pelo enovelamento espontâneo dos aminoácidos devido às condições fisiológicas em que se encontram. Esta complexidade é devida à rotação dos aminoácidos em torno das ligações covalentes simples, dando origem a arranjos tridimensionais não sobreponíveis, gerando diversas conformações da mesma enzima. Existe apenas uma única conformação nativa, onde se mantém o seu potencial máximo activo [39].

Algumas enzimas para serem activas não necessitam de cofactores, sendo que outras requerem cofactores, que são pequenas moléculas orgânicas ou inorgânicas (na ausência destes estas enzimas tornam-se inactivas) [40].

A função dos catalisadores nas reacções químicas é diminuir a energia de activação, uma vez que a enzima se vai ligar a uma molécula de substrato, numa região específica, designada por centro activo [40].

Em 1894, Emil Fischer propôs que a interacção entre uma enzima com o substrato fosse ajustada pelo modelo chave – fechadura. Este modelo significa que apenas um substrato (chave), pode encaixar no centro activo (fechadura) (Figura 9^[40]) [41].

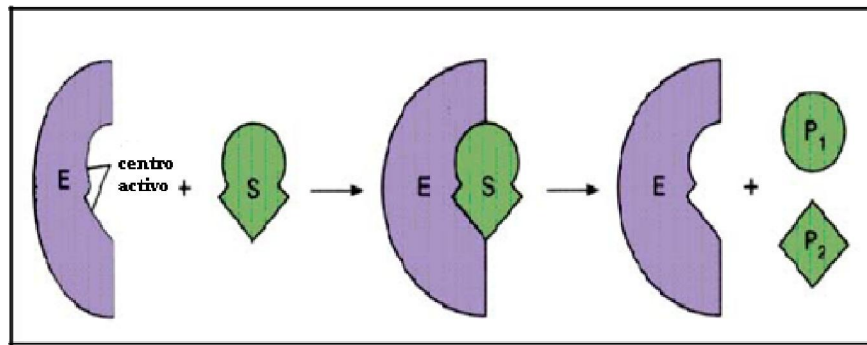


Figura 9- Complexo enzima – substrato

A actividade enzimática seria pouco eficaz, se a enzima fosse totalmente complementar ao seu substrato. Então em 1958 Koshland propôs o modelo de encaixe induzido, isto é, com a aproximação e a ligação do substrato à enzima, esta altera-se moldando a sua forma à forma do substrato, adquirindo a conformação ideal para a catálise. A conformação do substrato também é modificada, quando se aproxima do estado de transição. A Figura 10^[40] demonstra o mecanismo de catálise enzimática [40].

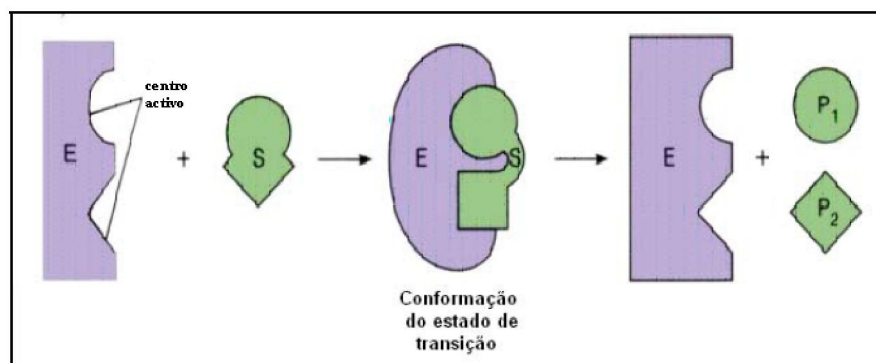


Figura 10- Esquema do modelo de encaixe induzido

1.4.1 Classificação e Nomenclatura das enzimas

Existe uma enorme variedade de enzimas que são conhecidas, mas para que estas não sejam designadas por nomes triviais, o que poderia resultar em ambiguidade, recorreu-

se uma classificação oficial, seguindo determinadas normas impostas pela “Enzyme Commission” da União Internacional de Bioquímica (IUB) [39].

A classificação das enzimas permite a divisão destas em seis classes diferentes de acordo com o tipo de reacção em que foi catalisada, como ilustra a Tabela 4.

Tabela 4- Nomenclatura e classificação de enzimas [42]

1º Dígito	Classe da enzima	Tipo de reacção catalisadas
1	Oxido-Redutases	Reacções de oxidação – redução
2	Transferases	Transferência de um átomo ou grupo entre moléculas
3	Hidrolases	Reacções de hidrólise
4	Liasas	Remoção de um grupo de uma molécula (sem ser por hidrólise)
5	Isomerasas	Reacções de isomerização
6	Ligases	Reacções de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

Assim, as enzimas são designadas por um código que as identifica, constituído por quatro dígitos. O primeiro dígito corresponde à classe a que a enzima pertence, o segundo está relacionado com a subclasse, o terceiro dígito representa a subsubclasse e o quarto dígito diz respeito ao arranjo da enzima dentro da subsubclasse [39].

1.4.2 Actividade enzimática

Existem vários factores que influenciam a actividade enzimática nomeadamente o pH e a temperatura [41].

A maioria das enzimas apresenta um pH característico no qual a sua actividade enzimática é máxima, isto é, têm um pH óptimo de actuação. Quando os valores de pH se encontram acima ou abaixo deste provocam, a diminuição da actividade enzimática [41].

A inter-relação da actividade enzimática com o pH apresentada por cada enzima, depende essencialmente do comportamento ácido – básico da enzima e do substrato [41].

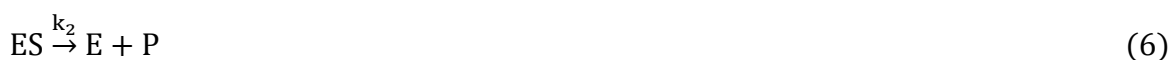
Na maioria das reacções enzimáticas a velocidade aumenta proporcionalmente à temperatura em que estas ocorrem. Sendo que as reacções enzimáticas apresentam uma temperatura óptima em que a velocidade de reacção é máxima [41].

Com o aumento da temperatura verifica-se um aumento da actividade enzimática até se atingir o seu ponto óptimo de actividade, mas devido à natureza proteica das enzimas, estas são desnaturadas pelo calor e vão-se tornando inactivas à medida que a temperatura aumenta, para além do seu ponto óptimo. Já quando estas estão sujeitas a temperaturas baixas, a sua actividade é muito baixa [41].

A reacção enzimática mais simples compreende apenas um único substrato a transformar-se num único produto. Inicialmente a enzima e o substrato reagem reversivelmente, dando origem um composto intermédio, o complexo enzima – substrato. Sendo que este complexo ou se regenera ou reage com outra substância, regenerando a enzima e formando os produtos da reacção [41].



O complexo ES dá origem a produto de reacção, P, regenerando-se a enzima livre, sendo que este é o passo mais lento, o que irá limitar a velocidade global da reacção [41].



A velocidade de reacção enzimática é proporcional à concentração do substrato, até se verificar saturação da enzima por este, sendo então a actividade independente da concentração do substrato [41].

Durante a reacção a enzima existe em duas formas, isto é, na forma livre ou não ligada ao substrato e na forma ligada ES. Sendo que a enzima estará na forma livre, quando está na presença de concentrações pequenas de substrato [S], uma vez que nestas condições, a velocidade de reacção será proporcional à [S], como representa a Figura 11^[40] [41].

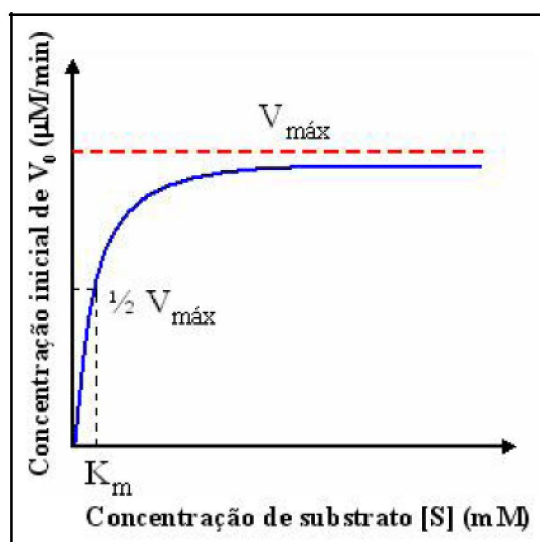


Figura 11- Efeito da concentração de substrato na velocidade inicial de uma reacção catalisada enzimaticamente.

A curva representada é idêntica para a maioria das enzimas, sendo expressa pela equação de Michaelis-Menten.

$$V_0 = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Esta equação relaciona a velocidade inicial V_0 , a velocidade inicial máxima e a concentração inicial de substrato $[S]$ com a constante de Michaelis-Menten K_m [40].

1.5 Aplicação das enzimas na indústria de pasta e papel.

A aplicação industrial das enzimas na indústria de pasta e papel tem evoluído desde a década de 80, sendo que até esta data a sua utilização era insignificante. As enzimas celulolíticas, ao longo dos anos vêm a ser intensamente investigadas e utilizadas em diversas aplicações, embora na maioria das áreas ainda se encontrem em desenvolvimento [43-44].

As enzimas utilizadas na indústria são provenientes de microrganismos, vegetais e animais. As enzimas de origem microbiana são as que se tornaram mais viáveis a nível industrial, dado o seu preço ser geralmente mais baixo [45].

A aplicação das enzimas na indústria depende da sua eficiência e também do seu custo de utilização. No caso da indústria de pasta e papel, para que a aplicação das enzimas seja um processo exequível tem que obedecer a dois requisitos essenciais, a estabilidade enzimática nas condições de operação (pH e temperatura), o baixo custo e a facilidade de obtenção das enzimas [43-44].

Na indústria de pasta e papel, as celulasas e as hemicelulasas apresentam boas potencialidades para modificar as características da pasta e do papel [43-44].

O tratamento enzimático conduz a alterações nas características das fibras de celulose das pastas Kraft, o que se traduz na alteração da qualidade do papel, visto que o tratamento da pasta através das celulasas leva a uma modificação das propriedades interfaciais das fibras, provocando o aumento da afinidade para a água, o que leva à alteração das propriedades técnicas da pasta e do papel, ou seja, a resistência do papel e a drenabilidade [43-44].

Existem ainda outras enzimas com aplicação biotecnológica na indústria de pasta e papel com activadores de branqueamento, pois melhoram a acessibilidade dos agentes químicos do branqueamento nas fibras. O processo de tratamento enzimático despertou elevado interesse uma vez que é o processo biotecnológico mais favorável que se apresenta em oposição às técnicas de branqueamentos tradicionais que tinham como desvantagens o impacto ambiental bem como o elevado custo de operação [43-44].

A influência destas enzimas na utilização da área de reciclagem do papel tem vindo a despertar grande interesse, visto que as fibras recicladas podem ser melhoradas através do tratamento com celulasas [43-44].

Este tratamento com a aplicação enzimática leva a uma redução do consumo energético durante a refinação, conduzindo a uma redução do tempo de refinação sem a alteração da resistência da pasta [43-44].

1.6 Celulases

As celulases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases, que degradam a cadeia polimérica, dando origem a polímeros mais curtos [46].

A degradação da celulose é pode ser realizada por celulases que são produzidas essencialmente por fungos, protozoários e bactérias. Estas apareceram como subprodutos da Segunda Guerra Mundial, e devido aos prejuízos que causavam nas roupas e equipamentos nas selvas do pacífico em 1944, vários militares norte americanos recolheram amostras destes microrganismos e levaram para o laboratório de pesquisas do exército. De entre as inúmeras amostras recolhidas, uma proveniente da Nova Guiné, mostrou conter o fungo *Trichoderma viride*, sendo actualmente designado por *reesei* em homenagem ao seu descobridor, Elwyn Reese. Este fungo tem a capacidade de converter a celulose em glucose [47-49].

O fungo voltou a despertar interesse a partir da década de 60, quando se descobriu a acção hidrolítica das enzimas extracelulares [47-49].

Existem ainda outros fungos produtores de celulases nomeadamente *Penicillium pinophilum* e *Humicola insolens*. Em relação as bactérias existem a *Cellulomonas fimi* e *Clostridium thermocellum* [50].

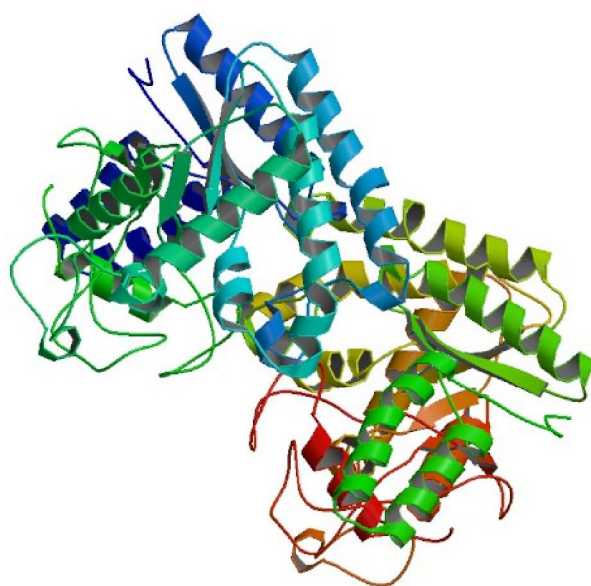


Figura 12- Representação da estrutura cristalográfica de uma celulase, produzida por *Trichoderma reesei*

Em comparação com outras enzimas as celulasas são pouco conhecidas, mas admite-se a existência de cinco tipos, sendo que três destes originam um complexo sinérgico, que é responsável pela hidrólise da celulose.[49].

Todos os tipos de celulasas vão actuar sobre as ligações β -1,4 entre duas unidades de anidroglicose, embora se diferenciem em relação ao local em que actuam na cadeia de celulose [51-52].

1.6.1 Classificação de Celulasas

As enzimas que actuam na celulose são classificadas em três grupos distintos: [51-54]

- As endo-1,4- β -D-glucanase ou (1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolases, E.C. 3.2.14), são um grupo de enzimas que quebram as ligações β -1,4 aleatoriamente na região amorfa da cadeia de celulose, levando a um aumento do número de terminais não redutores, conduzindo à alteração do grau de polimerização. Esta hidrólise confere a estrutura cristalina da celulose, uma vez que a hidrólise ocorre apenas em nas regiões amorfas (a celulose cristalina ou Avicel não é atacada significativamente por este tipo de enzimas). O principal produto desta reacção é a celobiose. [51-54].

De notar que o índice de hidrólise de cadeias longas de celooligossacarídeos é elevado, uma vez que esta aumenta com o grau de polimerização [51-54].

- As exo-1,4- β -D-glucanase, são um grupo de enzimas que realizam a sua actividade enzimática sobre os terminais não redutores da cadeia. Existem dois tipos de exo-glucanases que diferem do modo de actuação, isto é, as exo-glicohidrolases (1,4- β -D-glucanoglicohidrolases, E.C. 3.2.1.74) que desempenham a função de remover as unidades de glicose e as exo-celobiohidrolases (1,4- β -D-glucano celobiohidrolases, E.C. 3.2.1.91) que têm a função de remover os resíduos de celobiose. Sendo que estas últimas são as que se encontram com maior frequência, e libertam pequenas quantidades de glicose a partir da celulose. Quanto maior for o grau de polimerização mais

intensamente são hidrolisadas a celobiose e as cadeias longas de celooligossacarídeo [51-54].

Neste caso o Avicel ou celulose cristalina é o substrato que é mais vantajoso para o isolamento e quantificação das celobiohidrolases [51-54].

- As β -D-glicosidases ou Celobiasas (β -D-glicosídeo-glicosil-hidrolase, E.C. 3.2.1.21), são das enzimas mais relevantes no grupo das celulasas, uma vez, que convertem a celobiose e outras celodextrinas, reduzindo o peso molecular. Quanto mais elevado for o grau de polimerização, menos intensa será a hidrólise de celooligossacarídeos pelas β -glicosidases. Estas enzimas não são consideradas celulasas específicas, pois apenas auxiliam na acção das celulasas na remoção dos resíduos de celobiose que apresentam efeitos inibitórios [51-54].

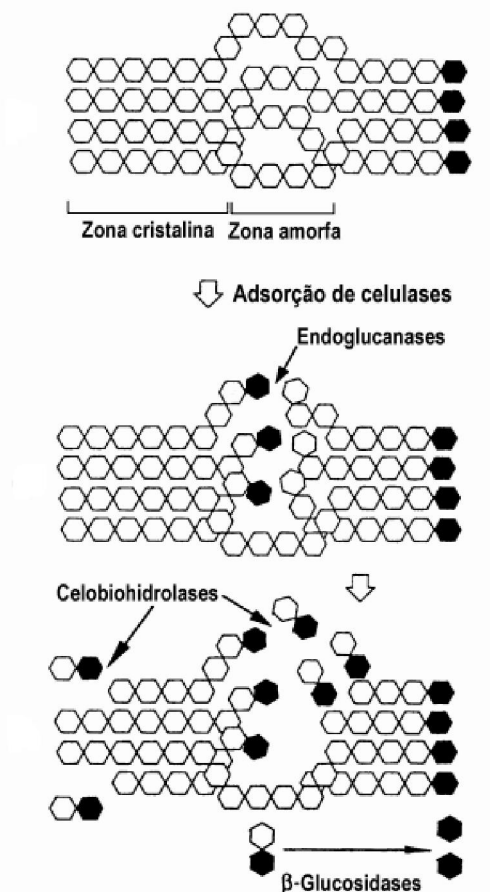


Figura 13- Mecanismo de degradação enzimático – sinergia entre endo- e exo-glucanases

1.7 Microrganismos envolvidos na degradação da celulose

Os microrganismos que se encontram envolvidos na degradação das pastas celulósicas produzem enzimas extracelulares que provocam a degradação da parede celular, sendo que cada mecanismo de degradação conduz a diferentes modificações das propriedades morfológicas, físicas e químicas da madeira biodegrada [55-56].

Os microrganismos celulares que promovem a biodegradação da madeira encontram-se entre diversos grupos taxonómicos, sendo que nestes microrganismos inserem-se os fungos, bactérias e os actinomicetos [55-56].

1.7.1 Produção de celulasas por bactérias e fungos

A produção de celulasas por bactérias dá-se por dois tipos, isto é, por bactérias anaeróbicas e bactérias aeróbicas, sendo o sistema enzimático das bactérias predominantemente intracelular, contrariamente aos fungos [55-57].

Já no caso da produção das celulasas através de fungos esta também se combina por dois tipos, fungos anaeróbicos e fungos aeróbicos, onde se irá dar mais ênfase aos fungos aeróbicos [55-57].

Os fungos ao longo dos tempos vêm despertando um enorme interesse devido à variedade de enzimas produzidas. Estes microrganismos exercem um papel relevante na natureza, pela sua competência de auxílio na nutrição e na actividade da decomposição da matéria orgânica em função da sua aptidão de degradação [55-57].

Entre os fungos aeróbicos, têm-se os fungos de decomposição branca, marron e ainda de decomposição branda, sendo estes os mais importantes na biodegradação dos resíduos lignocelulósicos [55-57].

A madeira é o componente que é mais lentamente atacado por microrganismos celulolíticos, devido a elevada quantidade de lenhina presente nesta. Através do processo oxidativo, que é efectuado por poucos microrganismos, por exemplo pelo fungo da degradação branca, consegue-se a degradação completa da lenhina [55-57].

Existe uma ampla diversidade de microrganismos nomeadamente os actinomicetos, que são competentes para a realização da deslignificação parcial para obtenção do substrato celulósico [55-56].

O fungo *Trichoderma reesei* é um deuteromiceto altamente celulolítico, sendo o microrganismo que desperta mais interesse, mas existem outros fungos que também conseguem produzir o complexo enzimático celulolítico, ou seja a celulase. Estes fungos produzem elevadas quantidades de endoglucanases, alguma quantidade de β -glicosidase e pouca exoglucanase [55-57].

1.8 Problemas relacionados com aplicação de enzimas nos materiais lenhocelulosicos

No tratamento enzimático da pasta de papel o problema fundamental está interligado com a complexidade das interacções entre a enzima e substrato, cuja correcta interpretação é indispensável a optimização desta técnica. Devido à variedade de substratos disponíveis nas indústrias papeleiras, estes dificultam a eficácia das enzimas bem como a optimização dos métodos biológicos. A actividade da enzima modifica-se mediante a natureza da pasta a tratar, os factores que delimitam a hidrólise enzimática são o grau de organização molecular dos constituintes da pasta, o estado da superfície das fibras, a natureza da fibra, ou seja, a área superficial específica, a porosidade, bem como a organização molecular dos seus constituintes, e ainda um outro factor que limita a hidrólise é o conteúdo de lenhina [58-61].

Outro dos problemas verificados na aplicação das enzimas nos materiais lenhocelulosicos é as características das enzimas, uma vez, que a especificidade e as suas propriedades influenciam na dimensão da degradação [58].

Para além das características do substrato bem como das enzimas, as condições de operação são fundamentais no tratamento enzimático pois afectam o comportamento das enzimas relativamente a um dado substrato, particularmente no processo de adsorção. Para que isso não se verifique as variáveis de operação mais relevantes são: a consistência da pasta, uma vez, que uma elevada consistência favorece a adsorção enzimática o que por consequência aumenta a superfície de ligação disponível. O tempo de reacção também é

fundamental no processo, uma vez que elevados períodos de tempo de aplicação da enzima levam à desnaturação ou à perda da actividade desta. Também se deve ter em consideração a agitação, pois uma agitação moderada fomenta a adsorção garantindo a dispersão da enzima, tornando-a acessível a novas superfícies de ligação. Já uma agitação elevada provoca a desnaturação da enzima. A temperatura de operação é uma variável importante no processo pois pode originar alterações de conformações das enzimas, tornando estas incapazes de adsorver e de degradar os substratos, levando mesmo a desnaturação da enzima se tivermos em condições extremas para a operação desta. Outra das variáveis que leva a modificações do tratamento enzimático é o ambiente químico, uma vez que o pH perturba o intumescimento e a carga superficial das fibras, que por consequência a acessibilidade à matriz fibrosa e à adsorção serão modificadas. E a ainda a acção enzimática pode ser inibida pela concentração dos metais pesados que se encontram na suspensão [58, 62-64].

1.9 Processamento a alta pressão

1.9.1 Sistema de alta pressão

A tecnologia de alta pressão inicialmente é usada há muitos anos na produção de diferentes materiais, como cerâmica, plásticos e diamantes artificiais. Mas na actualidade têm alcançado um elevado interesse em várias áreas nomeadamente nos campos da química, física e biologia [65-66].

Esta tecnologia é relativamente recente na indústria alimentar, mas tem tido um impacto positivo, uma vez que apresenta soluções para as exigências dos consumidores que pretendem produtos com elevada qualidade, com aparência de frescos, mais seguros, minimamente processados, livres de aditivos e estáveis durante o seu armazenamento [65-66].

Em alternativa aos métodos tradicionais de preservação, como os convencionais tratamentos térmicos, o aquecimento provoca modificações indesejáveis nos produtos, isto é, na redução das propriedades organolépticas e nutritivas. A utilização de alta pressão surge como sendo uma técnica inovadora, no qual os primeiros estudos efectuados sobre o

efeito de alta pressão em alimentos e microrganismos realizados por Hite em 1889 demonstraram a inactivação dos microrganismos e das enzimas contidas nos alimentos. Esta técnica apenas causa pequenas modificações na qualidade nutricional e sensorial, protegendo as propriedades naturais dos alimentos [67-68].

A alta pressão pode ser aplicada ou não em simultâneo com elevadas temperaturas [69-73].

Nos últimos 20 anos, a nível industrial começou-se a usar a alta pressão para a conservação dos alimentos, primeiramente no Japão e posteriormente na Europa [66-67, 74].

O processamento por alta pressão consiste na utilização de diferentes pressões entre os 100 e 800 MPa, sendo eficaz na destruição de células vegetativas abrangendo também as leveduras e os bolores. Quando combinada com a temperatura leva a destruição de esporos [70-71].

1.9.2 Princípios do método de alta pressão hidrostática (HPP)

O processamento de alta pressão é um novo método de processamento de produtos alimentares, consistindo em submeter os produtos a altas pressões [75].

A alta pressão pode ser originada por compressão directa ou indirecta. Na compressão directa, a pressão é gerado com um pistão, dentro do recipiente de pressurização. No caso da compressão indirecta, existe com amplificador de alta pressão que bombeia o fluido para dentro do recipiente através de um sistema de tubos [75].

O meio transmissor de pressão que normalmente é usado é a combinação da água com o óleo vegetal ou mineral, sendo que esta combinação tem como finalidade o efeito de anticongelante e anticorrosivo. Quando a pressão pretendida é alcançada, o nível de pressão mantêm-se durante o processo, sem necessitar de mais energia [72].

O método de alta pressão fundamenta-se em dois princípios, isto é, no princípio Isostático e no princípio de *Le Chatelier* [67-77].

No caso do princípio isostático como se pode verificar na Figura 14^[44], este descreve que a pressão exercida é transmitida independentemente do seu tamanho,

geometria e composição de forma uniforme e instantânea através do material biológico [67-77].

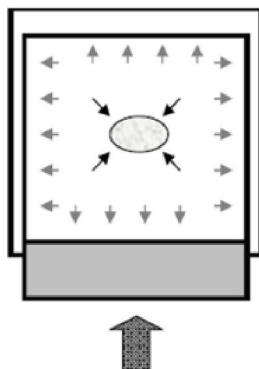


Figura 14- Representação esquemática do princípio isostático do processamento por alta pressão ^{adaptado}

Em relação ao princípio de *Le Chatelier*, este define que um sistema em equilíbrio responde a qualquer perturbação, com uma alteração que tende a contrariar a perturbação a que foi sujeito [44].

1.9.3 Método de alta pressão e fenómeno de hornificação

O fenómeno de hornificação está relacionado com o processo de cozimento, branqueamento e secagem da pasta. As principais causas relatadas para a hornificação são a transformação estrutural irreversível das fibras, a irreversível capacidade de reformar as ligações de hidrogénio que são destruídas após a saída da água durante o processo de secagem e ainda a perda de percentagem significativa de capacidade de retenção de água (WRV) [32, 78].

As alterações morfológicas das fibras estão relacionadas com as propriedades físicas e químicas das fibras de celulose que são perturbadas pela capacidade de inchamento na presença de água, que se tornam vulneráveis ao humedecimento e à secagem [32, 78].

Durante o processo de secagem, as fibrilas formam um aglomerado tornando a estrutura supramolecular mais rígida [32, 78].

A Figura 15^[32] ilustra a função da água e das hemiceluloses durante o processo de secagem, evitando que o fenómeno ilustrado aconteça [32].

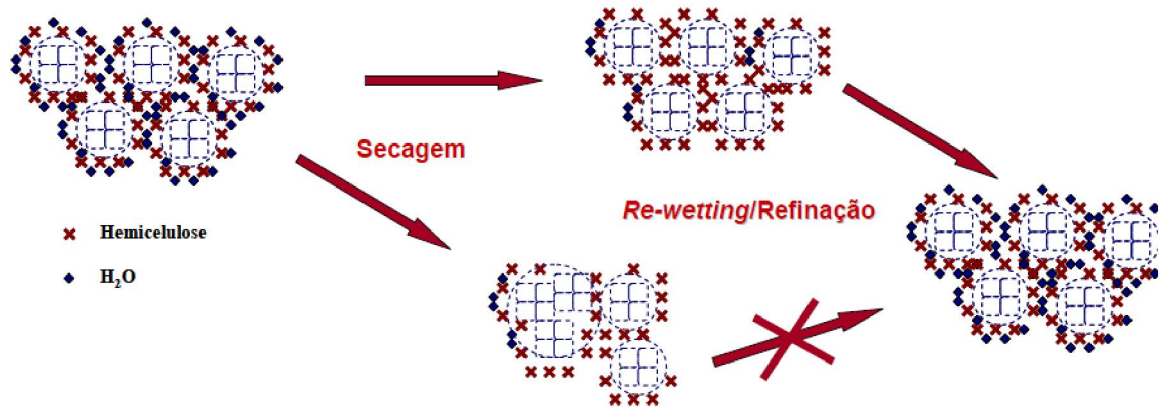


Figura 15- Mecanismo de agregação das microfibrilas durante a secagem

O fenómeno de hornificação também é afectado por dois tipos de alterações na estrutura supramoleculares, isto é, a cocrystalização e a recristalização [32].

A cocrystalização consiste na modificação ocorrida na estrutura supramolecular da celulose paracristalina durante o processo de secagem, onde se formam cocrystalitos, isto é, a agregação de um ou mais crystalitos formados pelas microfibrilas como representa a Figura 16^[32] [32].

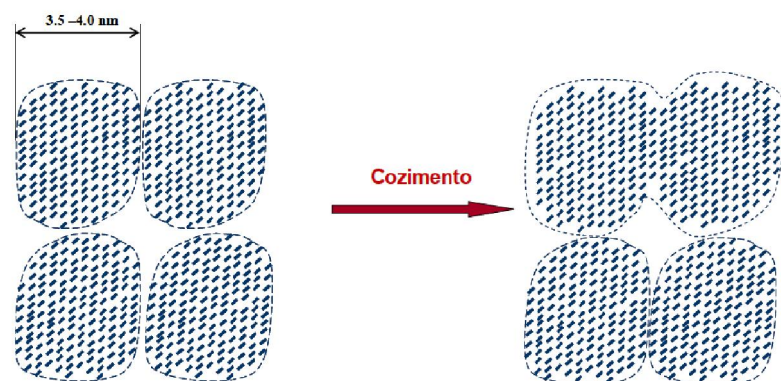


Figura 16- Representação do fenómeno de cocrystalização da celulose

O fenómeno de recristalização baseia-se na alteração da celulose paracristalina em cristalina, isto acontece após o processo de secagem onde a água sai e a celulose paracristalina ordena-se passando a celulose cristalina como apresenta a Figura 17^[32] [32].

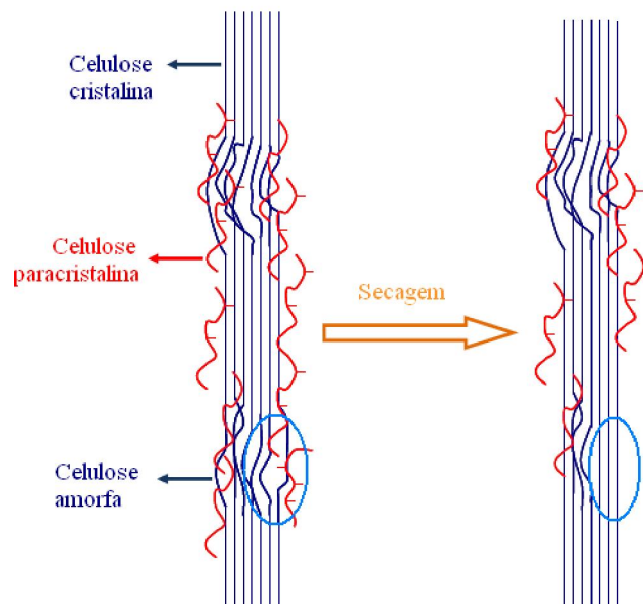


Figura 17- Representação do fenómeno de recristalização da celulose ^{adaptado}

A recristalização da celulose aumenta o grau de cristalinidade da fibra, tornando esta mais rígida [32].

Contudo uma alternativa encontrada para superar os problemas de re-hidratação das pastas celulósicas foi o tratamento de alta pressão, isto é, o tratamento hiperbárico.

Estudos efectuados anteriormente, indicaram a possibilidade de a alta pressão poder reduzir significativamente o processo de hornificação, em pastas celulósicas seca, o que poderá trazer vantagens muito significativas para a indústria de pasta de papel [1].

Capítulo II Materiais e Métodos

Com a realização deste estudo pretendeu-se avaliar o efeito que o tratamento hiperbárico exerce na hidrólise da pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus* com celulase. A primeira fase do trabalho consistiu na caracterização química da pasta celulósica utilizada, de modo a conhecer com rigor a sua composição (teor de cinzas, teor de extractáveis, teor de açúcares neutros). De seguida determinaram-se as condições óptimas necessárias para a actuação da celulase para a reacção de hidrólise enzimática, através da realização de testes preliminares usando como substrato a carboximetilcelulose (CMC). Após optimização procedeu-se à hidrólise enzimática das pastas celulósicas com e sem pré-tratamento a alta pressão hidrostática, acompanhando a reacção pelo método de DNS. No final, as pastas celulósicas obtidas após reacção foram caracterizadas e quantificado em termos de açúcares neutros.

Na presente secção apresenta-se uma descrição detalhada de todas as técnicas e procedimentos executados no trabalho de investigação desenvolvido. Podem aqui ser consultadas todas as informações relevantes relativas aos materiais e instrumentos utilizados. É de realçar que para cada ensaio apresentado foram efectuadas pelo menos duas réplicas.

2.1 Caracterização da pasta de *Eucalyptus globulus*

A pasta utilizada na realização deste trabalho experimental foi preparada a partir de pasta de *Eucalyptus globulus* seca industrialmente, fornecida pela empresa Portucel Soporcel em Cacia. A pasta foi obtida pelo processo kraft e branqueada segundo uma sequência ECF (livre de cloro elementar), DE_pDD, apresentando uma brancura de 90% ISO.

Para uso posterior ao longo das experiências, intumesceram-se 400g da pasta fornecida, em água destilada durante 48 horas e, após desintegração e filtração por vácuo, esta foi depositada em tabuleiros, onde permaneceu a secar ao ar durante 3 dias. Após esse

período recolheu-se a pasta e armazenou-se num saco devidamente fechado de modo a evitar o contacto com o ar.

2.1.1 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade da pasta foi determinado pelo método de secagem na estufa segundo a Norma internacional ISO 638. Pesou-se $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta num copo previamente pesado e colocou-se o conjunto na estufa (Heraeus Modelo UT6) a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, até se obter peso constante. O teor de humidade na pasta foi obtido através da equação 8.

$$w (\%) = \left(1 - \frac{m_{\text{amostra húmida}}}{m_{\text{amostra seca}}}\right) \times 100 \quad (8)$$

2.1.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada por incineração segundo a Norma Tappi T211 om-93. Calcinaram-se cadinhos de porcelana na mufla durante 1 hora, deixando-os a arrefecer num exsiccador para depois serem pesados. De seguida pesou-se $1\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de amostra para cada cadinho e colocou-se o conjunto na mufla a 525°C durante 2 horas. Após a incineração estar completa removeram-se os cadinhos da mufla, deixando-os a arrefecer num exsiccador à temperatura ambiente. A determinação do teor de cinzas foi obtida pela equação 9.

$$z (\%) = \frac{m_{\text{cinzas}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (9)$$

2.1.3 Determinação do teor de extractáveis em acetona

Efectuou-se a determinação do teor de extractáveis em acetona de acordo com a Norma Tappi T 204 om-88. Pesaram-se rigorosamente $6\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de amostra com humidade conhecida num cartucho de extracção e efectuou-se a montagem do extractor Soxhlet (50 ml) de acordo com a Figura 18. Pesou-se um balão de fundo redondo e adicionaram-se 200 ml de acetona. Ligou-se a manta de aquecimento e efectuou-se a extracção durante 4h. De seguida evaporou-se o solvente no evaporador rotativo e

secaram-se os extractos na estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ até atingir peso constante. Por fim, pesou-se o balão com os extractáveis.

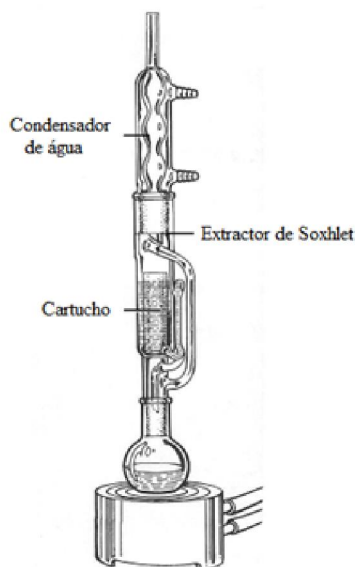


Figura 18- Montagem Experimental do extrator tipo Soxhlet.

A determinação do teor de extractáveis foi efectuada recorrendo à equação 10.

$$E_x (\%) = \frac{m_{\text{extractáveis}}}{m_{\text{amostra seca}}} \times 100 \quad (10)$$

2.1.4 Determinação do teor de açúcares neutros

A obtenção dos açúcares neutros baseia-se na hidrólise ácida dos polissacarídeos. A hidrólise foi realizada tratando aproximadamente 10 mg de pasta de papel com 400 μL de H_2SO_4 a 72%. Após este processo, o preparado foi incubado á temperatura ambiente (25°C) durante 3 horas num digestor Clifton, modelo BH-1/DIG. Seguidamente foram adicionados 4,4 ml de água destilada voltando-se novamente a incubar o preparado, mas desta vez á temperatura de 100°C durante 2 horas e 30 minutos.

Posteriormente procedeu-se á redução dos açúcares. Para tal, arrefeceu-se o hidrolisado e adicionou-se 200 μL de 2 - desoxiglucose como padrão interno. A cerca de 1,0 ml de hidrolisado acrescentou-se em gelo 0,2 ml de NH_3 a 25% e, imediatamente após,

0,1 ml de NH_3 de 3M contendo 150 mg/ ml de NaBH_4 para a redução dos monossacarídeos a alditóis. Incubou-se novamente a amostra à temperatura de 30°C durante 1 hora.

Depois da redução dos açúcares, efectuou-se a eliminação do NaBH_4 em excesso através da adição de 50 μL (duas adições) de ácido acético glacial, e arrefeceu-se em gelo.

Para a ocorrência do processo de acetilação dos alditóis, acrescentaram-se ainda 0,45 ml de 1-metilimidazol e 3 ml de anidrido acético a 0,3 ml de solução, levando novamente a solução a incubar durante 30 minutos a uma temperatura de 30°C.

A destruição do anidrido acético e a extracção dos acetatos de alditol das amostras foi realizada pela adição de 4,5 ml de água destilada e de 3 ml de diclorometano. A amostra foi agitada e centrifugada (2000 rpm, 30 segundos), procedendo-se à aspiração da camada superior (aquosa). Voltou-se a adicionar 3 ml de água destilada e 2 ml de diclorometano, agitou-se, centrifugou-se e aspirou-se novamente a camada superior. Adicionaram-se mais 3ml de água destilada, seguida do vórtex, centrifugação e aspiração e repetiu-se este passo mais duas vezes. Seguidamente realizou-se a evaporação do diclorometano sob atmosfera de azoto.

Após a evaporação do diclorometano adicionou-se 1 ml de acetona à solução e procedeu-se à evaporação desta em atmosfera de azoto. Repetiu-se mais uma vez a adição e a evaporação da acetona, ate à evaporação completa.

A quantificação dos acetatos de alditol foi realizada num cromatógrafo de gás Varian 3350 com a injeção de 0,2 μL da amostra. Para a quantificação utilizaram-se rectas de calibração elaboradas antecipadamente. As condições cromatográficas foram as seguintes:

- ❖ Temperatura do injector: 220°C;
- ❖ Temperatura inicial da coluna: 220°C (5 minutos);
- ❖ Gradiente de temperatura: 10°C/min;
- ❖ Temperatura final da coluna: 230°C (6 minutos);
- ❖ Temperatura do detector: 230°C;

2.2 Determinação da recta de calibração da glucose a partir do método de DNS

A recta de calibração da glucose foi determinada a partir da determinação de açúcares redutores recorrendo ao método de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), Figura 19 [79]. Foi necessário preparar uma solução de glucose com a concentração de 1g/ml, onde a partir desta foram preparados diversos padrões com diferentes concentrações (0 g/ml, 0,1 g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml, 0,5 g/ml, 0,6 g/ml, 0,8 g/ml).

A cada padrão foi retirado 1,0 ml e colocado num tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1 ml de DNS, sendo agitado no vórtex a 5000 rpm durante breves segundos e colocado num banho termostático a 100°C durante 5 minutos. Terminado esse tempo a amostra foi retirada e colocada noutro banho para arrefecer com água à temperatura ambiente.

Posteriormente ao arrefecimento dos tubos de ensaio foram adicionados 10 ml de água destilada, agitando-se novamente no vórtex a 5000 rpm, sendo depois lida a absorvância num espectrofotómetro do visível (modelo UVmini- 1240 da marca Shimadzu) a 540 nm.

Após a leitura de todas as absorvâncias das soluções padrão determinou-se a recta de calibração da glucose, fazendo uma regressão linear da absorvância em função da concentração de glucose.

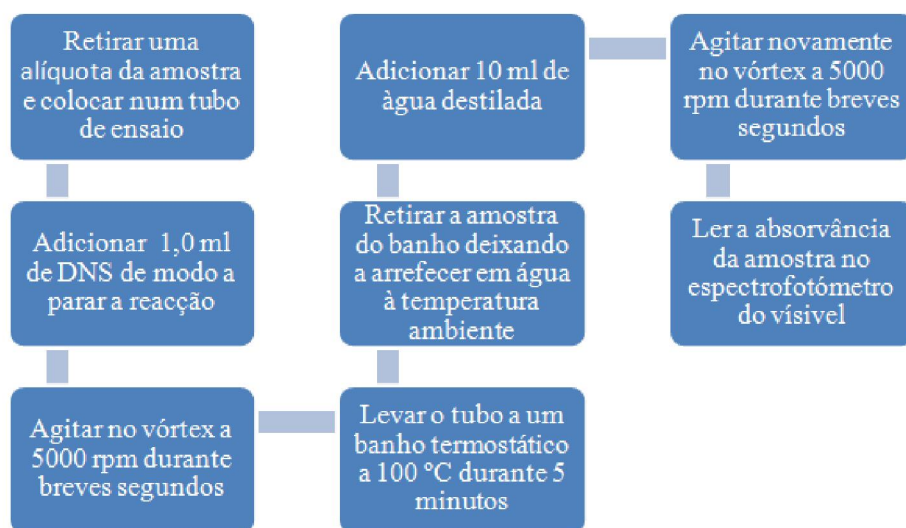


Figura 19- Esquema do método de DNS

2.3 Características da enzima utilizada - celulase

A enzima utilizada neste trabalho foi uma celulase obtida através do fungo *Tricoderma virido*, cujo o nome comercial é 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucano 4-glucano-hidrolase. Esta enzima é comercializada pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), com número de código C9422. Esta celulase apresenta uma actividade enzimática de 9 U/ mg, sendo definida uma unidade enzimática (1 U) como a quantidade de enzima que liberta 1 μ mol de açúcares redutores por minuto expresso em glucose. O seu pH óptimo de actuação é de 5 e a temperatura recomendada é por volta dos 37 °C.

2.4 Optimização das condições de hidrólise enzimática da celulase utilizando como substrato artificial CMC

2.4.1 Solução de CMC 1% (wt) utilizada como substrato

Pesou-se 1g \pm 0,001g de CMC da marca Fluka Sigma-Aldrich Co. (número de código CAS 9004-32-4, densidade de 1,59 e ponto de fusão de 270°C) para um copo e dissolveu-se em 80 ml de solução tampão de acetato de sódio 0,05M (pH 5) sob agitação. Após dissolução, a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml e o volume completado com a solução de acetato de sódio (0,05M e pH=5). Homogeneizou-se e guardou-se no frio a 4°C.

2.4.2 Determinação da actividade enzimática da celulase em CMC

A actividade enzimática da celulase foi quantificada pela quantidade de açúcares redutores totais libertados, obtida através do método do DNS apresentado na Figura 19, utilizando como padrão a glucose e como substrato CMC em 1% de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5).

Inicialmente colocou-se 15 ml da solução de CMC a 1% (p/v) num reactor associado a um banho termostático (modelo Thermo Haake K10) a 40° C de modo a

manter constante a temperatura de operação. Depois da CMC se encontrar à temperatura desejada (40°C), adicionou-se 0,5 ml de enzima previamente diluída. Esta reacção ocorreu sempre com agitação constante 2000 rpm.

Ao longo da reacção enzimática foram retiradas várias alíquotas de 0,5 ml da mistura reaccional em tempos previamente determinados, para a determinação dos açúcares redutores pelo método de DNS descrito na Figura 19. De modo a que o valor das absorvâncias estivesse de acordo com a gama de valores da recta de calibração da glucose determinada anteriormente, foi necessário diluir algumas das alíquotas retiradas ao longo do tempo em 2 ml de tampão de acetato de sódio (0,05M e pH 5).

Foi realizado um ensaio controlo efectuado apenas com a amostra do substrato artificial, sem a adição de enzima, segundo o procedimento descrito anteriormente. Para efeitos de cálculos, o valor da absorvância do ensaio controlo foi subtraído ao valor das absorvâncias das restantes amostras.

2.5 Hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

2.5.1 Hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* sem pré-tratamento de alta pressão

Pesaram-se $0,04\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* e intumescceu-se em solução tampão de acetato de sódio 0,05M (pH 5) durante 24 horas sob agitação. A mistura foi desintegrada e filtrada por vácuo. Pesou-se novamente a pasta intumescida, estando esta pronta para ser usada como substrato na hidrólise enzimática.

O procedimento, bem como o equipamento e as condições de operação utilizado para a determinação da actividade enzimática da celulase na pasta kraft foram semelhantes ao efectuado e descrito para a CMC em 2.4.2.

Inicialmente colocou-se a amostra de pasta intumescida juntamente com 6,8 ml de solução tampão acetato de sódio (0,05M e pH 5) no reactor previamente aquecido a uma temperatura de 40°C, permanecendo a mistura sob agitação constante.

Para a determinação do ponto zero foram retirados 0,2 ml da mistura reaccional e colocados num eppendorf sendo centrifugados a 5000 rpm durante um minuto (marca

Zentrifugen, modelo mickro 120). Após a centrifugação foi retirado 0,1 ml da fracção sobrenadante que foi colocada num tubo de ensaio seguindo o procedimento representado na Figura 19.

Após a leitura da absorvância do ponto zero, adicionou-se 1,2 ml da solução de enzima, começando a partir desse instante a reacção enzimática. Foram retiradas várias alíquotas em tempos pré-determinados realizando-se de forma análoga o procedimento citado para o ponto zero.

2.5.2 Hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* com pré-tratamento de alta pressão

Os estudos de alta pressão foram executados num aparelho High Pressure U33, produzido pelo *Institute of High Pressure Physics* na Polónia, que possibilita submeter amostras seladas de variados volumes (mililitros) a elevadas pressões e a diferentes temperaturas, quer à temperatura ambiente, quer a temperaturas superiores ou inferiores a essa.

Este equipamento é composto por um termóstato de circulação comercial e por uma unidade móvel principal conforme ilustra a Figura 20. Os elementos de alta pressão encontram-se situados por detrás de um escudo de segurança na parte traseira do equipamento. O vaso de alta pressão onde se processam as amostras está preenchido com um líquido de pressurização, apresentando um sistema de fecho em rosca. A pressão e a temperatura do sistema são visualizadas no painel de controlo do aparelho.

Neste processo é necessário proteger a amostra em embalagem flexível, uma vez que o vaso de alta pressão onde a amostra irá ser processada já se encontra preenchido com um líquido transmissor de pressão. As características principais do aparelho encontram-se ilustradas na Tabela 5.



Figura 20- Equipamento High Pressure U33

Tabela 5- Características principais do equipamento de High Pressure U33.

Intervalo de Pressão permitido	0-700 MPa
Temperatura mínima/máxima permitida	-20/100 °C
Volume	100 ml
Diâmetro do vaso	35 mm
Dimensões máximas dos invólucros selados	Ø34 x 98 mm (90 ml)
Líquido de pressurização	Propilenoglicol:Água destilada 60:40

Pesaram-se $0,16\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* para um copo deixando-a a intumescer em solução tampão de acetato de sódio (0,05M e pH 5) durante 24 horas sob agitação. A mistura foi desintegrada e filtrada por vácuo e dividida e colocada em 4 frascos, cada um com 32 ml da solução tampão. Posteriormente estes frascos foram colocados num invólucro selado a vácuo, de modo a minimizar o risco de rebentamento durante a pressurização e procedeu-se ao tratamento a alta pressão da pasta. As amostras de pasta foram submetidas a diferentes combinações pressão/tempo, que podem ser consultadas na Tabela 6.

Após o tratamento hiperbárico, as amostras foram filtradas sob vácuo e conservadas no frio a 4°C. A hidrólise enzimática da pasta pré-tratada foi efectuada segundo a metodologia descrita em 2.5.1, acompanhando a reacção pelo método DNS.

Tabela 6- Tratamento que as pastas sofreram sobre o efeito de alta pressão

Ensaio	Pressão exercida na pasta (MPa)	Tempo em que as pastas estiveram submetidas à pressão (minutos)
1º	300	15
2º	300	45
3º	400	5
4º	400	15
5º	400	45

2.6 Sistema sinérgico entre a xilanase e a celulase na hidrólise de celulose de pasta kraft pré-tratada a alta pressão.

2.6.1 Hidrólise enzimática sequencial das pastas kraft (xilanase seguida de celulase) com pré-tratamento de alta pressão.

A primeira hidrólise foi efectuada pela endo xilanase sendo esta obtida do fungo *Thermomyces lanuginosus*, cujo nome comercial é Pentopan Mono BG. Esta enzima é comercializada pela Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO), com número de código X2753. Esta xilanase apresenta uma actividade enzimática de 2500 FXU (W) /g, sendo definida FXU como unidades fúngicas de xilanase em trigo. O seu pH óptimo de actuação é entre 4 e 6 e a temperatura recomendada deve ser inferior a 75°C.

Após a hidrólise da pasta pré-tratada a alta pressão com a xilanase, efectuou-se uma nova hidrólise com a celulase, cujas características estão descritas em 2.3.

Começou-se por determinar a actividade enzimática da xilanase sendo esta quantificada pelo método de DNS através da quantidade de açúcares redutores totais libertados. Foi usada como padrão a glucose e como substrato a pasta kraft de *Eucalyptus globulus* previamente tratada a 400 MPa durante 15 minutos em 1% (wt) de tampão de acetato de sódio (0,05M e pH 5). As condições óptimas para actividade da xilanase foram previamente estudadas na tese da Sandra Oliveira.

O equipamento usado e as condições de operação foram idênticos às descritas acima para a determinação da actividade enzimática da celulase em CMC.

Inicialmente colocou-se cerca de $0,5\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de pasta intumescida juntamente com 10 ml de solução tampão no reactor previamente aquecido a uma temperatura de 40°C , permanecendo a mistura sob agitação constante. Adicionaram-se posteriormente 0,25 ml da solução de xilanase, retirando várias alíquotas em tempos pré determinados seguindo o mesmo procedimento descrito em 2.5.1 para a pasta kraft sem pré-tratamento de alta pressão. A hidrólise enzimática da xilanase decorreu durante 75 minutos.

Após terminar a hidrólise enzimática da xilanase na pasta kraft, procedeu-se a filtração e lavagem com água destilada da pasta kraft presente no reactor. A esta pasta hidrolisada pela xilanase foram retiradas $0,16\text{g} \pm 0,001\text{g}$, juntamente com 6,8 ml de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5) e 1,2 ml da solução de celulase foram colocados no reactor previamente aquecido a uma temperatura de 40°C , permanecendo a mistura sob agitação constante. O restante procedimento da hidrólise enzimática é análogo ao descrito anteriormente para a hidrólise enzimática de xilanase, sendo que a hidrólise enzimática da celulase ocorreu durante 60 minutos.

Capítulo III Resultados e Discussão

Na presente secção apresentam-se os principais resultados obtidos e a respectiva análise dos mesmos. Respectivamente, poderão ser ainda consultadas nos Anexos A e B todas as tabelas e gráficos auxiliares à obtenção dos resultados apresentados e que incluem todos cálculos intermédios executados.

3.1 Composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

De modo a conhecer a composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*, usada como substrato na reacção de hidrólise enzimática, foram determinados os seus teores de cinzas, extractáveis e de açúcares neutros. Os resultados obtidos encontram-se compilados na Tabela 7.

Tabela 7- Composição química da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* branqueada (% de matéria seca)

Composição da pasta	Resultados experimentais (%)	Dados da literatura ^[80] (%)
Teor de cinzas	0,12	0,1-0,3
Teor de extractáveis em acetona	0,18	0,15-0,23
Teor de lenhina residual	0,20	0,1-0,3
Monossacarídeos anidros neutros:		
Arabinose	0,3	---
Xilose	15,8	14,0-18,0
Manose	0,4	0,2-0,3
Galactose	0,2	0,2-0,5
Ramnose	0,2	0,2-0,4
Fucose	0,1	---
Glucose	83,0	80,8-85,4

É possível verificar que a composição química determinada experimentalmente se encontra bastante próxima dos valores detalhados na literatura [80]. A caracterização e quantificação de açúcares neutros obtida correspondem aos valores típicos apresentados por pastas kraft de *Eucalyptus globulus* branqueadas por sequência ECF., onde os monossacarídeos mais abundantes são a glucose e a xilose, provenientes das glucuronoxilanas presentes nas pastas de folhosas.

3.2 Estudo da hidrólise enzimática da CMC com celulase

Com o intuito de encontrar as condições óptimas de operação da celulase, realizaram-se várias hidrólises enzimáticas com um substrato conhecido, a carboximetilcelulose. Este é um dos substratos artificiais mais frequentemente utilizados no estudo da actividade da celulase.

Os ensaios preliminares realizados com CMC tiveram como principal objectivo determinar as condições óptimas para a hidrólise, em termos da concentração de substrato. Conforme referido no capítulo anterior, a velocidade de hidrólise foi avaliada através da quantidade de açúcares redutores formados pelo método de DNS. Na Figura 21 encontram-se representados os resultados obtidos para as condições óptimas alcançadas:

- 15 ml de CMC;
- 0,5 ml de celulase, [celulase] = 5,56 mg/ml;
- T=40,0 °C;

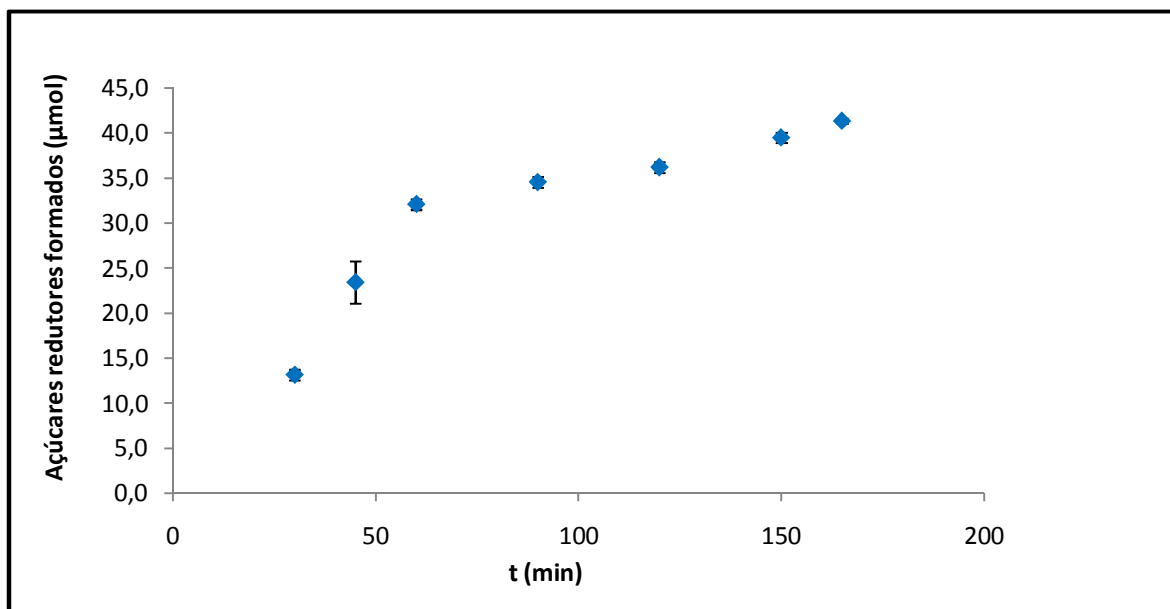


Figura 21-Quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo da hidrólise enzimática da CMC com celulase

Através da Figura 21 é possível observar que decorridos 100 minutos após o início da reacção, a quantidade de açúcares redutores se mantém constante, indicando que a partir desse instante já não é possível, hidrolisar maior quantidade de CMC. No final da reacção enzimática obtiveram-se 41,4 μmol de açúcares redutores.

Estes resultados foram comprovados após determinação da actividade da celulase ao longo do tempo de reacção (Figura 22). A análise dos dados obtidos demonstra que a velocidade máxima de hidrólise foi atingida perto dos 60 minutos. Conforme seria esperado, a partir desse instante a velocidade começa a diminuir, pois a quantidade de substrato disponível é menor.

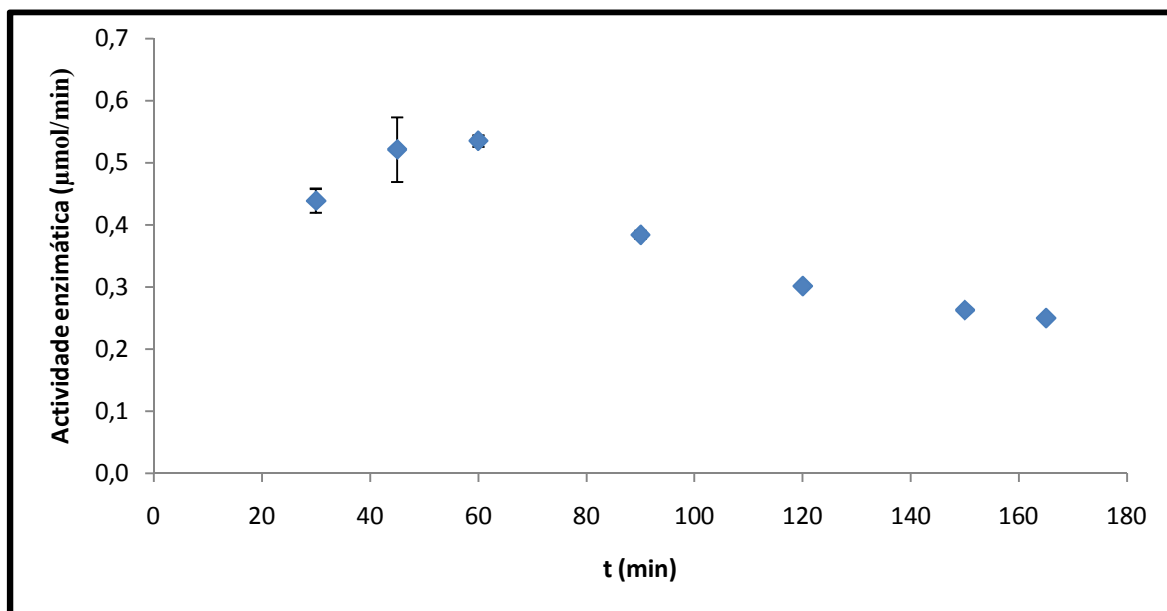


Figura 22- Atividade enzimática da celulase em CMC ao longo do tempo de hidrólise.

3.3 Hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* pela celulase

Após encontradas as condições ótimas para a hidrólise da CMC, estas foram aplicadas à reacção de hidrólise enzimática da pasta kraft com celulase (Figura 23).

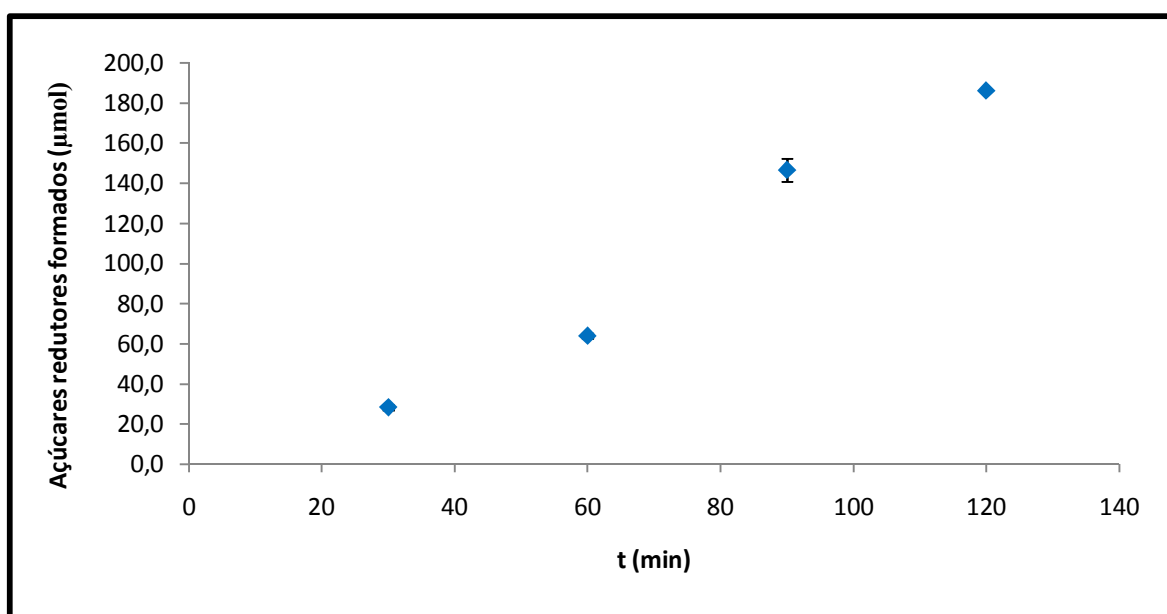


Figura 23- Quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo da hidrólise enzimática da pasta kraft com celulase

Contudo os resultados demonstram que com condições experimentais usadas não se verifica ocorrência de um patamar bem definido, ou seja, sem formação de mais açúcares redutores. Para atingir este objectivo realizaram-se mais ensaios, testando-se diferentes combinações de quantidade de pasta/concentração de enzima (Tabela 8).

Tabela 8- Características dos ensaios da hidrólise enzimática

Ensaio	Características	
	Quantidade de pasta seca ($\pm 0,0001\text{g}$)	Concentração da enzima (mg/ml)
1º	0,5020	5,56
2º	0,2510	5,56
3º	0,2513	22,22
4º	0,0400	22,22

Como com as condições anteriores se verificou novamente a impossibilidade de atingir a zona em que não ocorre mais formação de açúcares redutores, optou-se por aumentar a concentração da enzima. Os resultados obtidos podem ser consultados na Figura 24.

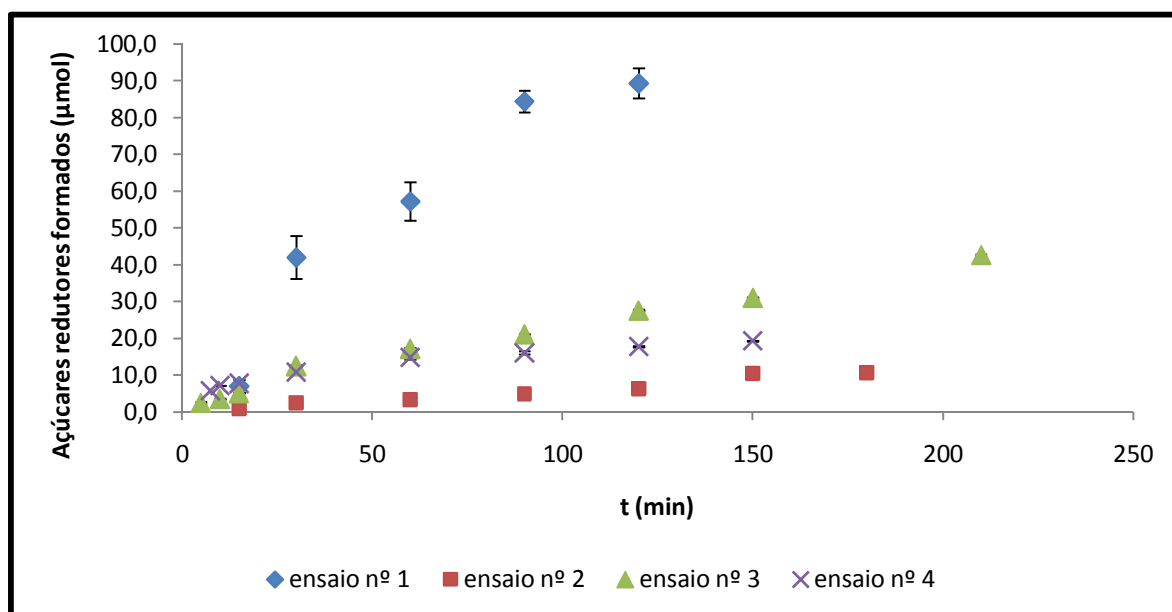


Figura 24- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados para quatro amostras de pasta kraft.

A análise da Figura 24 permite verificar que com o ensaio nº4 a partir dos 100 minutos a quantidade de açúcares redutores formados permanece constante.

Um dos objectivos deste trabalho também era reduzir o tempo de hidrólise enzimática e isso foi conseguido no ensaio nº 4, sendo esse ensaio controlo para comparar com as pastas tratadas a alta pressão. Com este ensaio foi ainda possível reduzir o tempo de reacção para atingir o patamar, sendo este o ensaio escolhido para representar as condições óptimas para a hidrólise de pasta kraft:

- 0,040 g de pasta kraft seca;
- 6,8 ml de tampão acetato de sódio (0,05 M e pH 5);
- 1,2 ml de celulase, [celulase] = 22,2 mg/ml;
- T=40,0 °C.

Como para esta reacção foi essencial regular a concentração de celulase a usar, avaliou-se o efeito que este parâmetro exerce sobre a quantidade de açúcares redutores formados. Para tal compararam-se os resultados obtidos para os ensaios nº 2 e 3, nos quais se mantém constante a massa de substrato e se varia a concentração de enzima (Figura 25). Verificou-se que o aumento da concentração de celulase causa um aumento da quantidade de açúcares redutores produzidos.

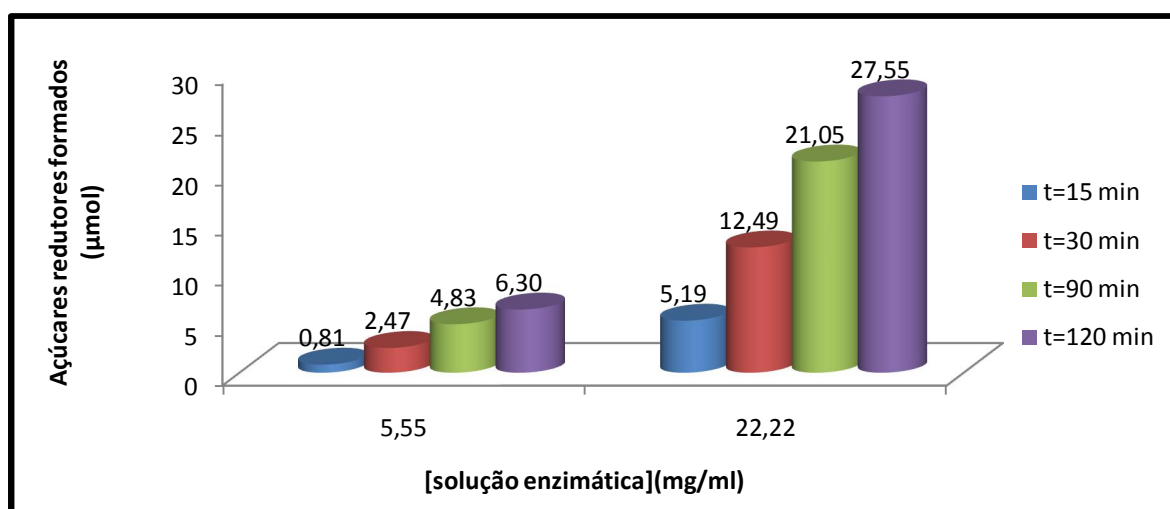


Figura 25- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados em função das duas concentrações de enzima utilizadas.

3.3.1 Estudo da influência da alta pressão na hidrólise enzimática

Após efectuada a optimização dos parâmetros experimentais a usar, partiu-se para o estudo do efeito do pré-processamento da pasta kraft a alta pressão na reacção de hidrólise com celulase. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas figuras seguintes, onde é possível comparar o comportamento da hidrólise de pastas com e sem pré-tratamento hidroestático.

Na Figura 26 compara-se a quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo de hidrólise de pastas processadas a 300 MPa, durante 15 e 45 minutos, com os resultados obtidos para a pasta não processada.

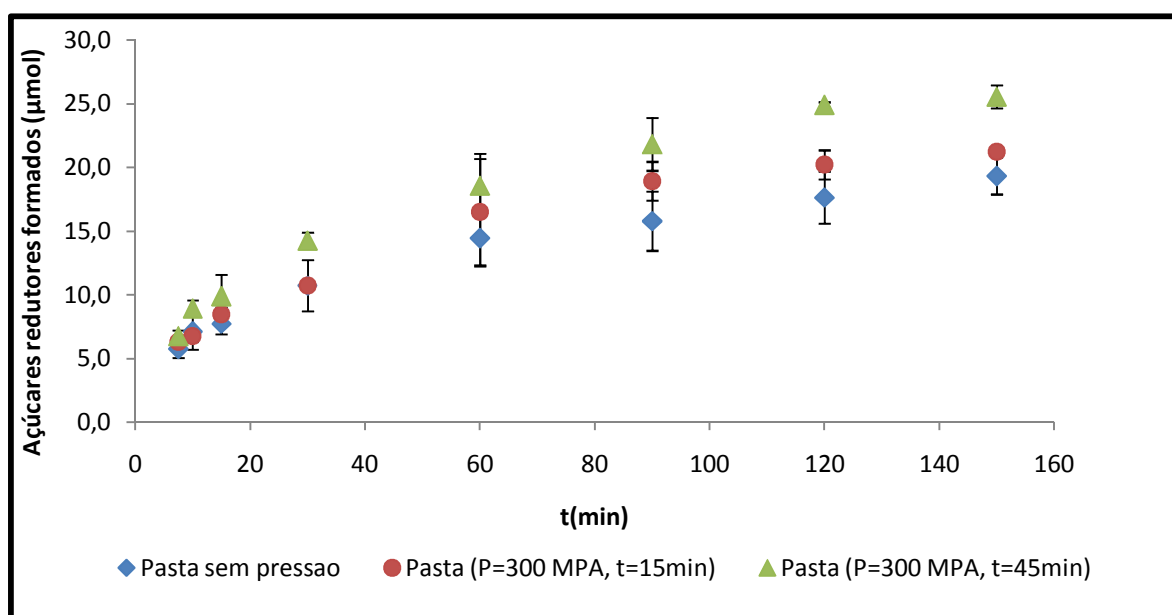


Figura 26- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo para as amostras que foram sujeitas a uma pressão 300 MPa e para a pasta não pressurizada.

Pela análise da Figura 26 verifica-se que o pré-tratamento a 300 MPa promove uma maior formação de açúcares redutores face à pasta não tratada, levando a crer que o processamento hiperbárico provoca o aumento da acessibilidade das fibras celulósicas face à acção da celulase. Este aumento torna-se mais visível ao aumentar o tempo de pressurização das amostras de 15 para 45 minutos, demonstrando que aumentando o tempo

durante o qual a pasta está submetida ao efeito de alta pressão se verifica um acréscimo significativo da celulose que é degradada durante a hidrólise enzimática.

Da Figura 26 há ainda a acrescentar que decorridos 30 minutos após o início da hidrólise enzimática da pasta pré-tratada a 300 MPa durante 45 minutos se obtêm aproximadamente a mesma quantidade de açúcares redutores (14,3 μmol) que passados 60 minutos de hidrólise da pasta não processada (14,5 μmol). Este comportamento demonstra claramente que o processamento a alta pressão é responsável por aumentar a velocidade e extensão da reacção de hidrólise. Observa-se ainda que a partir das 2.30h de hidrólise, o produto formado permanece constante para as três pastas que foram submetidas ao tratamento enzimático, o que mostra que a partir desse momento não ocorre mais hidrólise, provavelmente porque se atingiu o momento em que apenas a celulose de acesso difícil (fracção de celulose cristalina) se encontra disponível. Comparando os instantes finais da reacção (150 minutos), verifica-se ainda que a hidrólise da pasta processada durante 45 minutos originou um aumento de cerca de 133% nos açúcares redutores formados face à pasta controlo, evidenciando que este tratamento faz com que a celulase tenha maior facilidade em aceder e degradar a celulose, quebrando assim uma maior quantidade de ligações glicosídicas e permitindo uma hidrólise mais extensa.

Na Figura 27 apresenta-se o evoluir da actividade enzimática nas três pastas em função do tempo de reacção. Como seria de esperar, devido à diminuição da quantidade de substrato, com o decorrer da hidrólise a actividade da celulase diminui. No entanto, realça-se que nas pastas pré-processadas a alta pressão a actividade enzimática é tendencialmente superior à da pasta não processada.

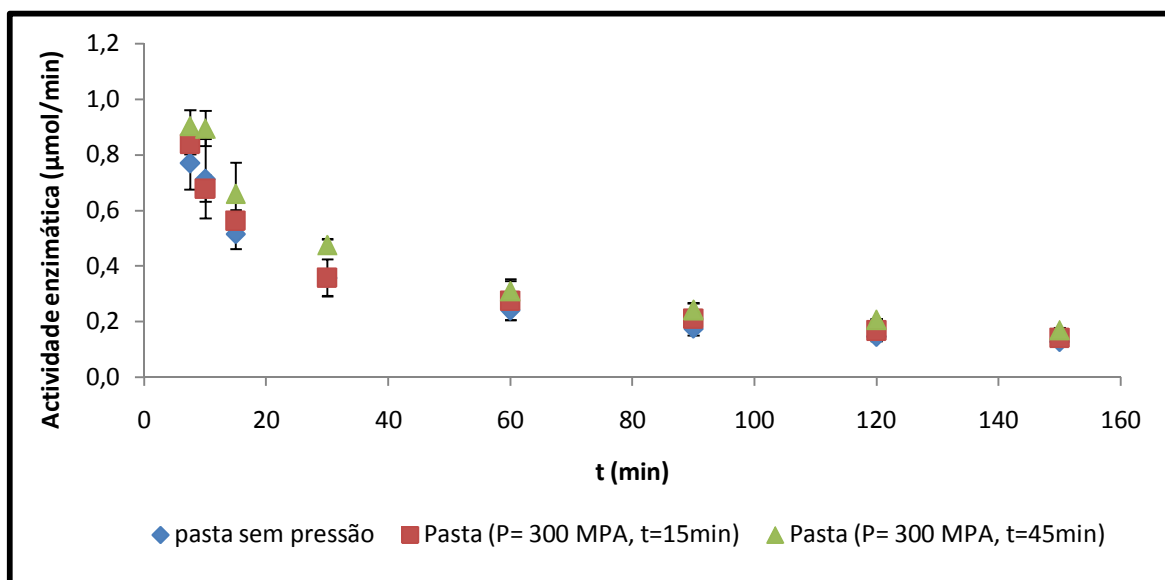


Figura 27- Actividade enzimática da celulase na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de reacção para a pressão de 300 MPa.

Na Figura 28 são apresentados os resultados obtidos para as pastas submetidas a 400 MPa durante 5, 15 e 45 minutos previamente à reacção de hidrólise. Para efeitos de comparação apresentam-se também os resultados obtidos para a pasta controlo, não sujeita a pré-tratamento hiperbárico.

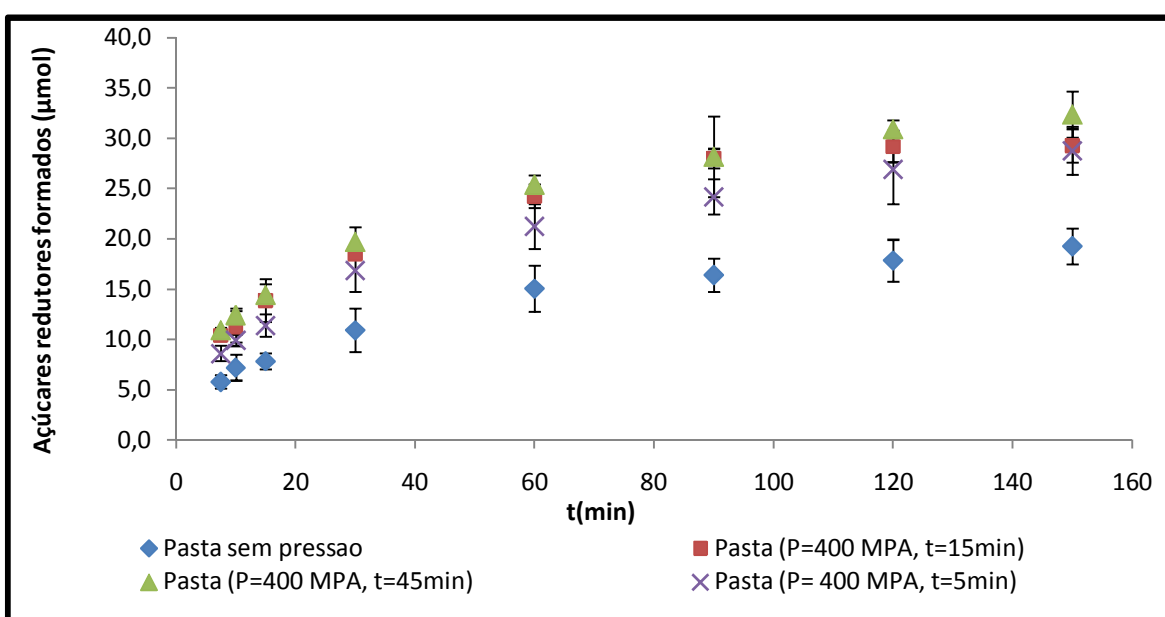


Figura 28- Comparação da quantidade de açúcares redutores formados ao longo do tempo para as amostras que foram sujeitas a uma pressão 400 MPa e para a pasta não pressurizada.

Os resultados apresentados revelam que, de forma semelhante ao verificado para as pastas tratadas a 300 MPa, o processamento hiperbárico a 400 MPa promove a formação de uma maior quantidade de açúcares redutores num menor intervalo de tempo de reacção. É de realçar que foram necessários 30 minutos para a pasta controlo conseguir dar origem a uma quantidade de açúcares redutores igual, ou inferior, às quantidades obtidas decorridos apenas 10 minutos da reacção de hidrólise das pastas pré-tratadas a 400 MPa, independentemente do tempo de pressurização.

Na Tabela 9 comparam-se os valores relativos de açúcares redutores obtidos aos 90 minutos de hidrólise enzimática das quatro pastas em questão. Os resultados demonstram que o tratamento hiperbárico melhora acessibilidade da celulose ao ataque enzimático, permitindo uma hidrólise mais extensa. Verifica-se ainda que o tempo durante o qual as amostras de pasta estão sob pressão representa um factor importante a ter em conta, pois para a mesma pressão, a amostra pré-tratada durante um maior intervalo de tempo consegue originar uma maior quantidade de açúcares redutores.

No entanto, as diferenças entre as pastas pré-tratadas durante 15 e 45 minutos não justificam que se prolongue o processamento por um intervalo de tempo 3 vezes superior. Por este motivo, todas as análises efectuadas de seguida são relativas à amostra de pasta hidrolisada previamente submetida ao efeito de 400 MPa durante 15 minutos.

Tabela 9- Quantidade de açúcares redutores obtidos aos 90 minutos da reacção enzimática

Pasta	Açúcares redutores formados (μmol)	Aumento (%)
Controlo	16,4	---
400 MPa, 5 min	24,2	~ 50
400 MPa, 15 min	28,0	~ 74
400 MPa, 45 min	28,1	~ 75

A Figura 29 apresenta a variação da actividade enzimática ao longo do tempo. Verifica-se que a velocidade enzimática aumenta gradualmente à medida que a pasta está durante um período mais longo sobre o efeito da pressão.

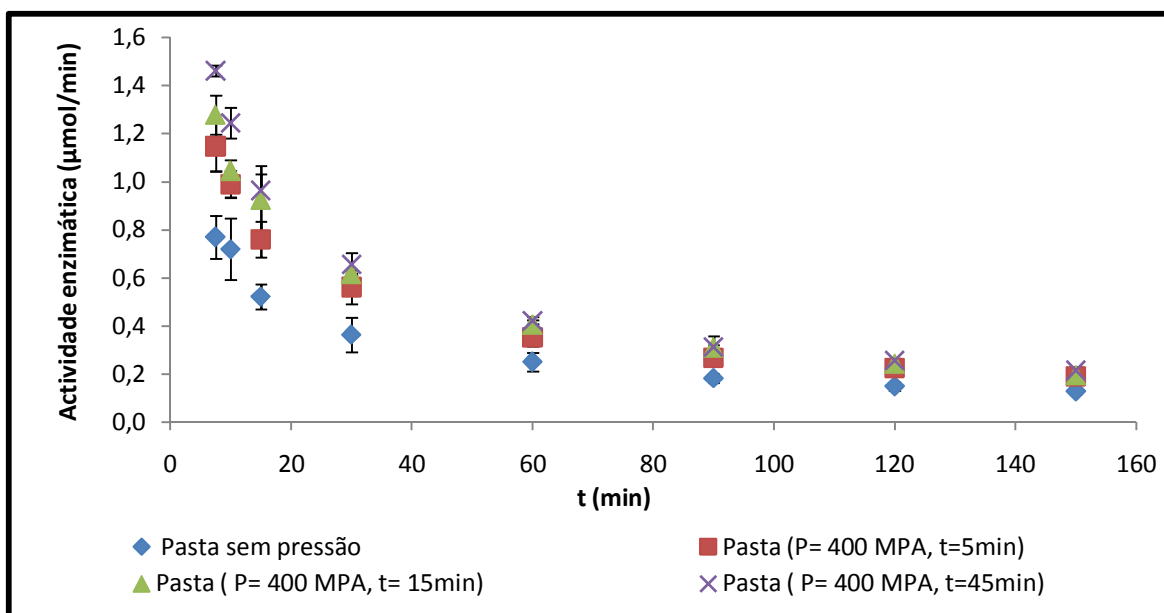


Figura 29- Actividade enzimática da celulase na pasta kraft de *Eucalyptus globulus* ao longo do tempo de reacção para a pressão de 400 MPa.

Perante os resultados obtidos, é interessante comparar de uma forma relativa o efeito que o pré-tratamento hiperbárico a diferentes pressões/tempos exerce na quantidade de açúcares redutores formados, de modo a concluir qual a combinação mais favorável para a hidrólise da pasta kraft com celulase. Esta informação encontra-se compilada na Figura 30.

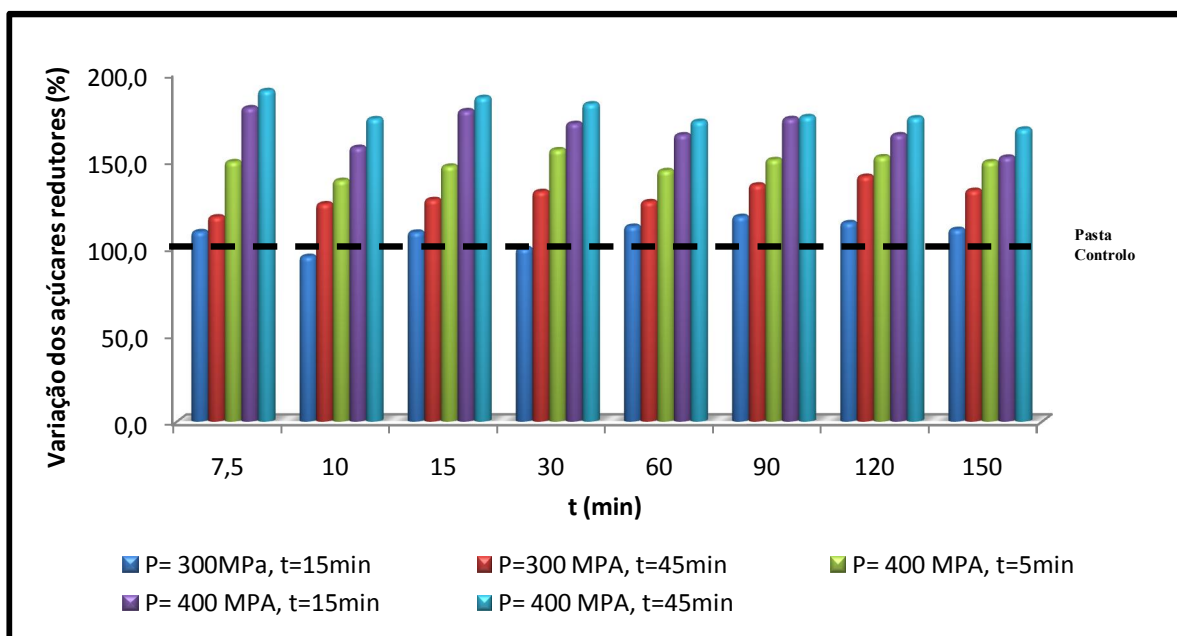


Figura 30- Percentagem da variação dos açúcares redutores formados, para as diferentes pressões e para os diferentes tempos de residência em que as pastas estiveram sujeitas ao efeito de alta pressão ao longo do tempo da reacção enzimática

De uma forma geral, à medida que se aumenta quer a pressão aplicada, quer o tempo de pressurização, ocorre um acréscimo dos açúcares redutores formados relativamente à pasta controlo. No entanto, os dados demonstram que a pressão é o factor dominante para a reacção em questão, pois os resultados obtidos com a pasta tratada a 400 MPa durante 5 minutos são superiores aos obtidos com a pasta tratada a 300 MPa durante 15 ou 45 minutos. Por esse motivo, estudou-se mais detalhadamente o comportamento das pastas kraft pré-tratadas a 400 MPa ao longo da hidrólise, de forma a avaliar qual o tempo de pressurização mais adequado e favorável para atingir as finalidades em causa (Figura 31).

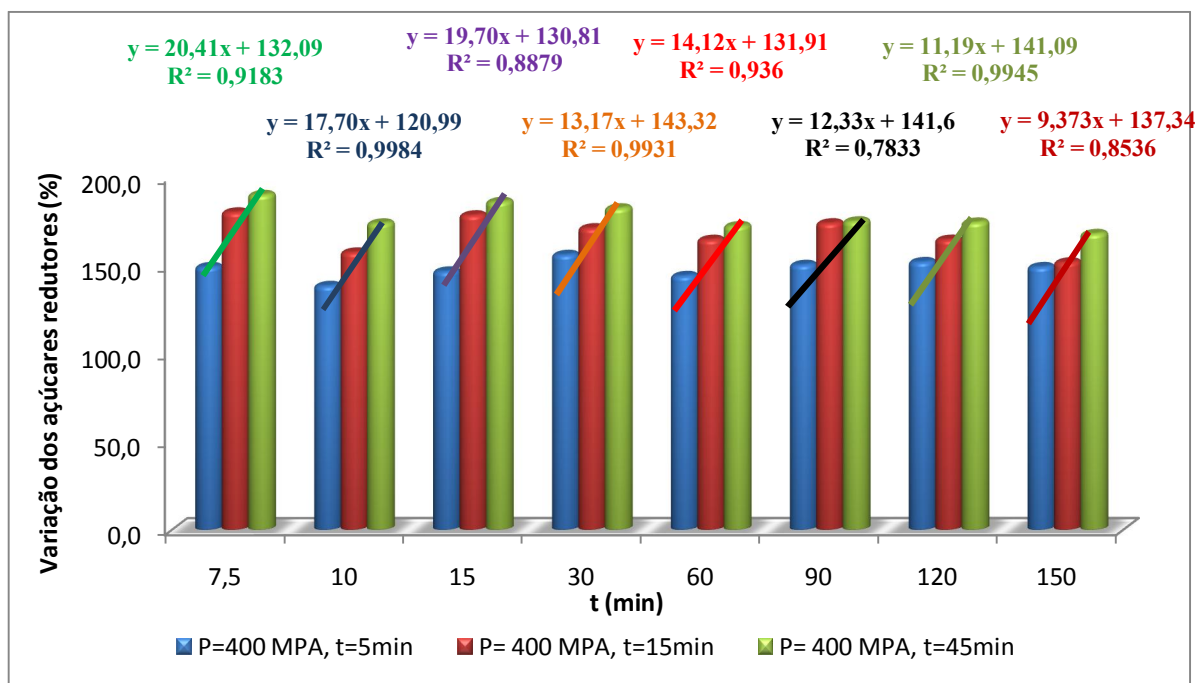


Figura 31- Percentagem da variação dos açúcares redutores formados, para a pressão de 400 MPa e para os diferentes tempos de residência a que as pastas foram submetidas a essa pressão, ao longo do tempo da reacção enzimática

É facilmente observável que as pastas tratadas a 400 MPa apresentarem uma maior percentagem de açúcares redutores formados para tempos de pressurização mais longos.

Os resultados revelam ainda que nos instantes iniciais da hidrólise, o efeito do tempo de pressurização é mais acentuado (as rectas apresentam maiores declives).

Perante os resultados obtidos, tentou-se encontrar uma explicação capaz de justificar as alterações que ocorrem ao nível da estrutura das fibras celulósicas durante o processamento hiperbárico e, que são responsáveis pelo aumento de acessibilidade das mesmas face à acção da celulase. Julga-se que sob o efeito de alta pressão, as microfibrilas de celulose se reorganizem, segundo o esquematizado na Figura 32.

Como é possível visualizar na figura, ao processar a pasta kraft a 300 MPa, as fibrilas elementares que se encontram mais próximas entre si reorganizam-se, havendo a oportunidade de ocorrer co-cristalização parcial dos cristalitos. Simultaneamente, durante este processo ocorre também o afastamento de algumas fibrilas, que têm tendência a ficarem parcialmente desagregadas e mais hidratadas, promovendo assim o aumento do espaço intrafibrilar. Como consequência, a celulose fica mais acessível para sofrer a acção

da celulase, que pode assim quebrar ligações glicosídicas da celulose anteriormente inacessíveis.

Quando o pré-tratamento das pastas ocorre a 400 MPa, o comportamento anteriormente descrito é intensificado, verificando-se que as fibras se tornam ainda mais hidratadas. Esta hidratação ocorre devido ao facto das moléculas de água ficarem retidas entre as fibrilas elementares, o que contribui para um maior aumento do espaço intrafibrilar face à pasta tratada a 300 MPa, facilitando ainda mais a passagem da enzima para as zonas anteriormente inacessíveis e tornando assim a hidrólise mais eficiente.

Para suportar estas afirmações, observaram-se as diferentes amostras de pasta ao microscópio.

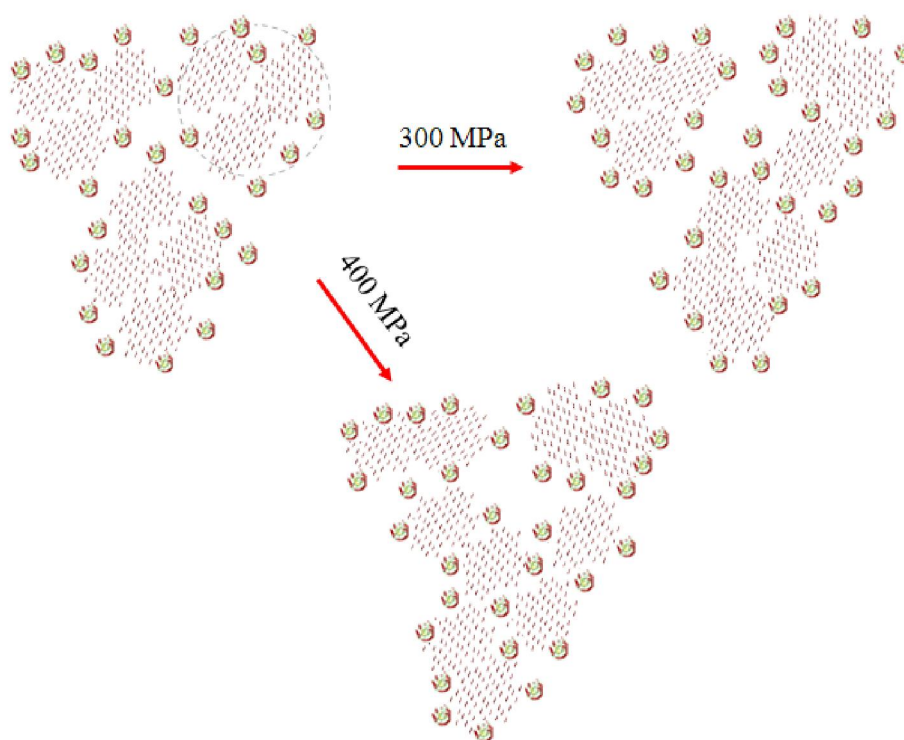


Figura 32- Representação esquemática do comportamento das microfibrilas de celulose quando sujeitas a um tratamento de alta pressão.

3.4 Análise de imagens de fibras em suspensão

Após a análise dos principais resultados alcançados, tentaram-se verificar quais as alterações ocorridas ao nível da estrutura supramolecular das fibras celulósicas, responsáveis por causar o aumento da acessibilidade da celulose face à hidrólise com celulase. Para isso, observaram-se as diferentes pastas ao microscópio óptico com luz polarizada.

Inicialmente foi efectuado um estudo isolado, apenas para verificar o efeito que a alta pressão exerce nas fibras. Observaram-se amostras de pastas tratadas a 300 MPa durante 15 minutos, e 400 MPa durante 15 e 45 minutos, comparando-se as imagens capturadas com as de uma amostra de pasta controlo, não submetida a tratamento hiperbárico (Figura 33).

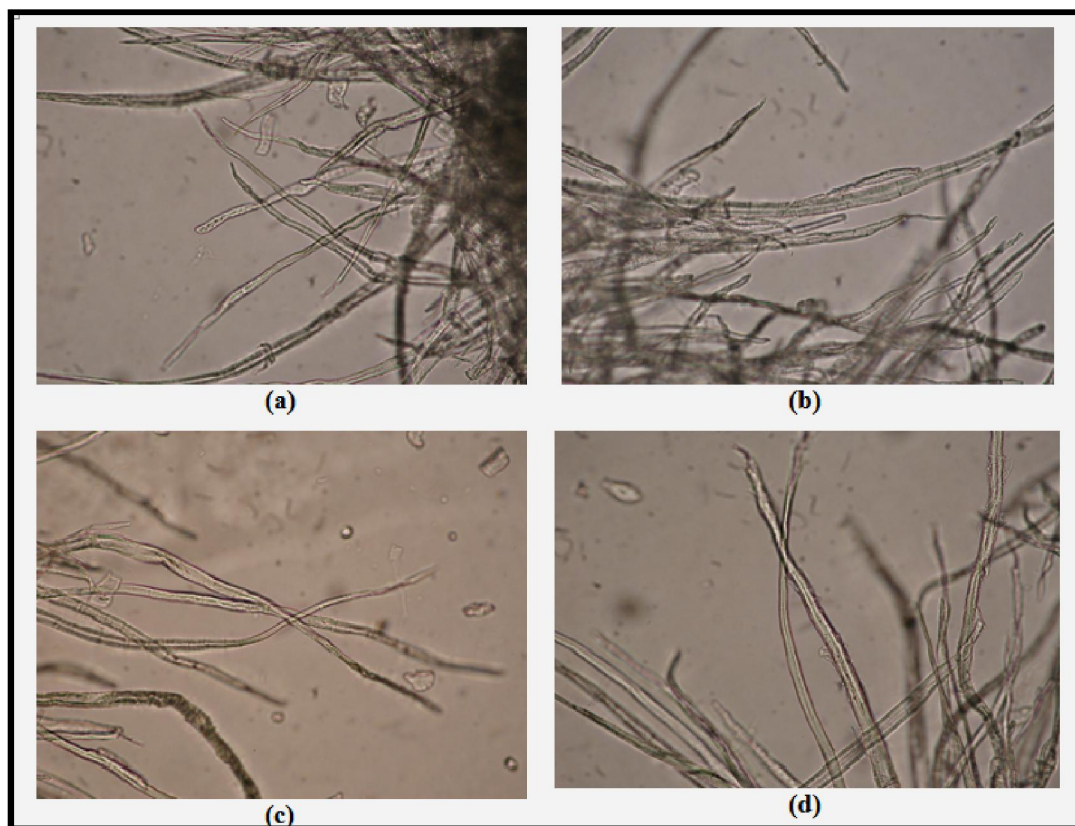


Figura 33- Fotografias da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* (observação microscópica com uma ampliação de 20x): (a) pasta sem tratamento de alta pressão, (b) pasta tratada a 300 MPa, durante 45 minutos, (c) pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos, (d) pasta tratada a 400 MPa durante 45 minutos

Pode-se analisar através da Figura 33 que as pastas que foram submetidas ao tratamento de alta pressão apresentam fibras mais inchadas e flexíveis (imagem d) do que a pasta sem tratamento de hiperbárico. Conforme é visível, quanto maior a pressão exercida na pasta, maior o intumescimento interfibrilar, fazendo com que o lúmen das fibras diminuía no sentido transversal. Estas observações suportam as explicações dadas anteriormente relativas à análise da Figura 32, sendo claramente visível que o processamento a alta pressão proporciona a hidratação das fibras. O efeito deste tratamento nas pastas deverá permitir um ataque mais externo a todas as regiões amorfas, que antes não estavam tão acessíveis à hidrólise enzimática. Isto irá provocar uma maior quebra das ligações glicosídicas, provocando a desfibrilação das fibras celulósicas, conforme ilustra a Figura 34.

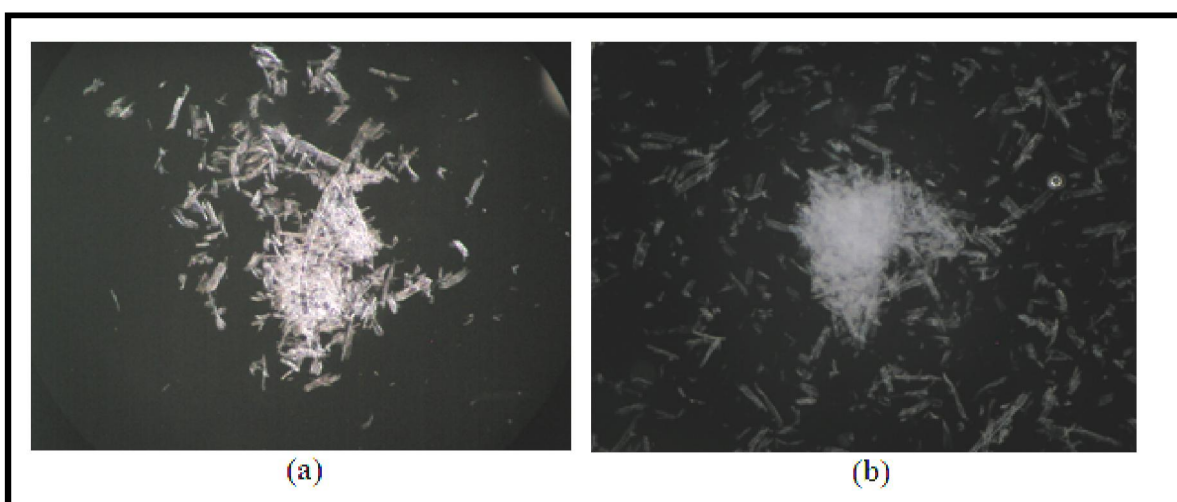


Figura 34- Fotografias da pasta kraft de *Eucalyptus globulus* (observação microscopia com a ampliação de 40x): (a) pasta hidrolisada mas sem tratamento de alta pressão, (b) pasta hidrolisada e tratada a 400 MPa durante 15 minutos

Na Figura 34 verifica-se que no caso da pasta que apenas foi sujeita à acção da hidrólise enzimática (a), se observam cristalitos de maiores dimensões do que os presentes na pasta tratada a alta pressão previamente à reacção de hidrólise. Isto significa que no caso da imagem (b), a enzima conseguiu penetrar mais facilmente na pasta, hidrolisando-a em maior extensão. Consequentemente, neste caso existiu uma maior quebra de ligações

glicosídicas e os cristalitos formados possuem menores dimensões, como se comprova comparando as duas imagens.

3.5 Caracterização e quantificação dos açúcares neutros da pasta kraft hidrolisada

Após a hidrólise enzimática, foi necessário analisar qual o efeito que o processamento hiperbárico exerce sobre a quantidade de celulose degradada durante a reacção. Para tal, a pasta hidrolisada foi caracterizada e quantificada em termos de açúcares neutros através de GC-MS. Os resultados obtidos encontram-se compilados na Tabela 10.

Tabela 10- Composição média em monossacarídeos da pasta kraft

Monossacarídeos anidros neutros:	Percentagem (%)		
	Pasta seca	Pasta intumescida e hidrolisada pela celulase	Pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos e hidrolisada pela celulase
Arabinose	0,3	0,1	4,5
Xilose	15,8	8,3	6,9
Manose	0,4	0,5	0,4
Galactose	0,2	0,1	3,1
Ramnose	0,2	0,0	2,3
Fucose	0,2	0,0	0,8
Glucose	83,0	91,0	82,0

Os resultados demonstram que recorrendo à hidrólise sem tratamento prévio por alta pressão, para além de glucose é também diminuído o teor de xilose. Este comportamento revela que ao remover as fracções de mais acessíveis da celulose, são também retiradas as hemiceluloses presentes na superfície das fibrilas elementares, na sua grande maioria xilanas. É de realçar que apesar do teor de glucose diminuir, na Tabela 10 este valor aumenta para 91%, pois o tratamento dos resultados tem em conta a média normalizada de todos os açúcares, fazendo com que a diminuição de xilose venha compensada no resultado apresentado neste monossacarídeo.

Quando se submete a pasta kraft ao efeito de alta pressão previamente à reacção de hidrólise, este provoca o aumento da acessibilidade das fibras celulósicas face à acção da celulase, permitindo degradar mais a celulose. Esta afirmação é comprovada pelos dados presentes na Tabela 10, onde se verifica que para esta amostra ocorre uma diminuição bastante significativa no teor de glucose face à pasta não hidrolisada. É de notar que mais uma vez se registou que juntamente com a celulose, foram também degradadas xilanas presentes na superfície das fibras, desta vez em maior extensão.

Em face destes resultados, surgiu a ideia de estudar o efeito que a combinação de duas enzimas, a xilanase com a celulase, poderia ter sobre a quantidade de celulose hidrolisada. Pensou-se que após a acção da xilanase, o acesso da celulase ficasse mais facilitada e permitisse degradar uma maior fracção deste polímero. Os resultados alcançados são apresentados na secção seguinte.

3.6 Estudo do complexo sinérgico entre xilanase e celulase na hidrólise enzimática da pasta kraft de *Eucalyptus globulus*

A escolha da combinação da celulase com a xilanase, baseou-se em estudos efectuados anteriormente por outros autores [81], que relatam que as hemiceluloses se depositam em duas zonas preferenciais da fibra celulósica: na camada superficial das fibrilas e entre as microfibrilas. Assim sendo, pensou-se que ao hidrolisar pasta pré-tratada a alta pressão numa primeira fase com xilanase e numa segunda fase com celulase, fosse possível libertar as fibras de componentes não celulósicos. Ao proceder à hidrólise da pasta com xilanase, poderia ser que esta enzima degradasse em maior extensão as hemiceluloses presentes na superfície das fibras e nas zonas interfibrilares, desbloqueando em grande parte o acesso da celulase a zonas anteriormente inacessíveis, possibilitando assim uma hidrólise mais extensa da celulose.

Porém ao analisar os resultados obtidos (Tabela 11), verifica-se que esta combinação não surtiu o efeito esperado, pois a quantidade de glucose presente na pasta não atingiu uma diminuição significativa.

Tabela 11- Composição média em monossacarídeos da pasta kraft após a combinação da xilanase com a celulase.

Monossacarídeos anidros neutros:	Percentagem (%)			
	Pasta seca	Pasta intumescida e hidrolisada pela celulase	Pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos e hidrolisada pela celulase	Pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos e hidrolisada pela xilanase e pela celulase
Arabinose	0,3	0,1	4,5	0,0
Xilose	15,8	8,3	6,9	9,3
Manose	0,4	0,5	0,4	0,0
Galactose	0,2	0,1	3,1	10,2
Ramnose	0,2	0,0	2,3	0,0
Fucose	0,2	0,0	0,8	0,0
Glucose	83,0	91,0	82,0	80,5

O facto da combinação das enzimas não ter proporcionado os resultados ambicionados, pode dever-se ao facto da celulase, quando actua isoladamente, já conseguir remover a quantidade máxima possível de hemiceluloses. Esta suposição é suportada pela Figura 35, onde apresenta a quantidade máxima de açúcares redutores formados ao longo do tempo de reacção para as pastas pré-tratadas a 400 MPa durante 15 minutos hidrolisadas com celulase e com a combinação xilanase/celulase.

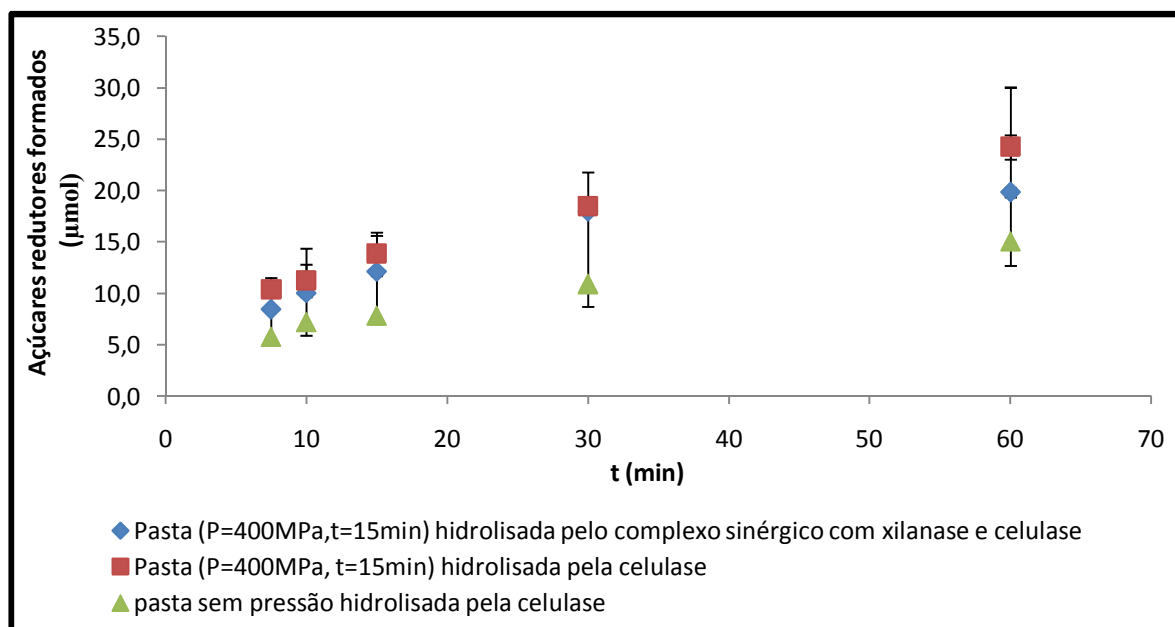


Figura 35- Resultados obtidos dos açúcares redutores formados ao longo do tempo do complexo sinérgico em comparação com a pasta com e sem tratamento hiperbárico hidrolisada pela celulase.

Através da análise da Figura 35 verificamos que a celulase, quando usada isoladamente, consegue produzir sensivelmente a mesma quantidade de açúcares redutores obtida após hidrólise com a combinação de enzimas, o que comprova que a combinação xilanase/celulase não trás grandes vantagens para a acessibilidade enzimática da celulase às regiões mais inacessíveis da celulose.

Capítulo IV Conclusão

Actualmente, o uso de celulases na indústria papelreira tem vindo a despertar um grande interesse. No entanto, usada isoladamente, a hidrólise enzimática com celulase não revela ser muito eficiente, apresentando diversas limitações. Por esse motivo, este trabalho consistiu no estudo da aplicação do processamento hiperbárico de pasta kraft de *Eucalyptus globulus* previamente à reacção de hidrólise com celulase, de modo a perceber se o pré-tratamento a alta pressão é capaz de melhorar a eficiência da reacção enzimática.

Após testar várias combinações pressão/tempo, verificou-se que as condições de pré-tratamento hiperbárico que proporcionam melhores resultados correspondiam à pasta tratada a 400 MPa durante 15 minutos. Para esta pasta, conseguiu-se nos instantes iniciais da hidrólise aumentar em cerca de 80% a quantidade açúcares redutores formados. Ficou provado que este pré-tratamento é responsável por aumentar quer a velocidade da reacção, quer acessibilidade das fibras ao ataque enzimático da celulase, permitindo hidrolisar a celulose em maior extensão. A análise microscópica das fibras hidrolisadas demonstrou que este tipo de processamento tornou as fibras mais inchadas e flexíveis, possivelmente devido à incorporação de moléculas de água. Provavelmente as moléculas de água ficaram retidas entre as fibrilas elementares adjacentes, promovendo o aumento do espaço intrafibrilar e aumentando assim a acessibilidade da celulose face à celulase.

O aumento da acessibilidade das fibras à hidrólise enzimática, proporcionou que a celulase fosse capaz de degradar não só as regiões amorfas e para-cristalinas da celulose, como também remover xilanas da superfície das fibrilas.

Com este trabalho conclui-se ainda que, mais importante do que o tempo sob o qual a amostra é submetida ao efeito hiperbárico, é a pressão aplicada. Por este motivo, julga-se que os resultados apresentados seriam ainda mais promissores se o pré-tratamento da pasta celulósica ocorresse a pressões superiores. Este tipo de processamento é bastante inovador e conseguiu superar alguns entraves existentes relativos à hidrólise enzimática de celulose pelos métodos convencionais, aumentando a velocidade e a quantidade de açúcares redutores formados.

Estes resultados poderão ser interessantes para desenvolver métodos mais eficientes de hidrólise da celulose, para a produção de glucose para obter bioetanol.

Bibliografia

- [1] A. Figueiredo, *et al.*, "Effect of high pressure treatment on structure and properties of cellulose in eucalypt pulps," *Cellulose*, vol. 17, pp. 1193-1202, 2010.
- [2] A. C. Salvador, *et al.*, "Effect of the ionic liquid [bmim]Cl and high pressure on the activity of cellulase," *Green Chemistry*, vol. 12, pp. 632-635, 2010.
- [3] Celpa. <http://www.celpa.pt>, (consulta em Março de 2010)
- [4] Pascoal Neto C. Evtuguin, D., "V.1- Componentes Macromoleculares da Madeira In Química de Polímeros," 2004.
- [5] Portucel-Soporcel. <http://www.portucelsoporcel.com> , (consultado em Março 2010)
- [6] D. Fengel, Wegener G. , *Wood Chemistry, ultrastructure, reactions*. N. York. USA, 1989.
- [7] E. Sjöström, *The Structure of Wood In: Wood Chemistry – Fundamentals and applications*. San Diego, USA: Academic Press, 1981.
- [8] D. Fengel, Wegener G. , *Structure and Ultrastructure in: Wood- Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st ed. Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co, 1983.
- [9] M. Fujita and H. Harada, *Ultrastructure and formation of wood cell wall, In: Wood and Cellulosic Chemistry*. New York: Eds, Marcel Dekker, 1991.
- [10] P. Béguin, Aubert, J. P. , *The biological degradation of cellulose*. vol. 13: FEMS Microbiology Reviews, 1994.
- [11] R. A. Parham, "Ultrastructure and Chemistry", in *Pulp and Paper Manufactures* vol. 1. Canadá: Canadian Pulp and Paper Association, 1983.
- [12] A. E. A. Azapagic, in *Polymers, the Environment and Sustainable Development*. Town: I. Hamerton, Editor, 2003.
- [13] Klemm, D., Philipp, B., et al.; *Comprehensive Cellulose Chemistry – Volume 1: Fundamentals and analytical Methods*; Wiley-VCH, Germany (1998)
- [14] A. H. Krassing, *Cellulose, Structure, Accessibility and Reactivity* vol. 11: Gordon and Breach Science Publishers, 1993.
- [15] E. Sjöström, *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*, 2^a ed. USA: Academic Press London, 1981.

- [16] Silva, C. R. d., Análise de variáveis processuais do Cozimento ao Sulfito Ácido de E. globulus,(Tese de mestrado), Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2008.
- [17] H. A. Krässig, "“The Fiber Structure”, em Cellulose. Structure, Accessibility and Reactivity," *Polymer Monographs, Gordon and Breach Science Publishers*, Yverdon, Switzerland, vol. 11, pp. pp. 6-41, 1993.
- [18] E. Sjöström, "Wood Polysaccharides", in: *Wood Chemistry, Fundamentals and Applications*. , 2^a ed. USA: Academic Press London, 1981.
- [19] Klemm D., Heublein B., Fink H.P., and Bohn A., Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44:3358-3393,2005.
- [20] E. Sjöström and U. Westermarck, *Chemical Composition of Wood and Pulp: Basic Constituents and Their Distribution*, In: *Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking*. Germany, 1999.
- [21] A. Ebringerová, "Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses," *Macromolecular Symposia*, vol. 232, pp. 1-12, 2005.
- [22] D. Fengel, Wegener, G. , *Polyoses (Hemicelluloses) in: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st ed. Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co, 1983.
- [23] K. Shimizu, *Chemistry of Hemicelluloses, In: Wood and Cellulosic Chemistry*. New York, USA: Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., 1991.
- [24] E. Sjöström, *The Structure of Wood In: Wood Chemistry – Fundamentals and applications*. San Diego, USA: Academic Press, 1981.
- [25] A. Sakakibara, *Chemistry of lignin In: Wood and Cellulosic Chemistry*. New York, USA: Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., 1991.
- [26] D. Fengel, Wegener, G. , *Lignin in: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st ed. Berlin, Germany: Walter de Gruyter & Co, 1983.
- [27] C. W. Dence, Lin, S. Y. , *Introduction In: Methods in Lignin Chemistry*. Berlin, Germany: Stephen Y. Lin, Carlton W. Dence, 1992.
- [28] E. Sjöström, *Lignin In: Wood Chemistry – Fundamentals and applications*. San Diego, USA: Academic Press, 1981.
- [29] B. J. Fergus, Goring, D. A. I. , *Distribution of lignin in Birchwood as determined by ultraviolet microscopy* vol. 24: *Holzforschung*, 1970.

- [30] Y.-Z. Lai, *Chemical Degradation In: Wood and Cellulosic Chemistry*. New York: Hon, D. N.-S., Shiraishi, N., 1991.
- [31] IRVINE, *et al.*, *Extended delignification of mature and plantation eucalypt wood. Part I: The principles of extended delignification* vol. 49. Carlton, AUSTRALIE: Appita, 1996.
- [32] Santos, F. R. d., Efeito do teor e estrutura de xilana de pastas brancas de *E. globulus* na sua tendência para a hornificação, (Tese de mestrado) Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2005.
- [33] A. Mimms, *Kraft Pulping: a compilation of notes*, 2nd ed.: Tappi Press, 1993.
- [34] D. Fengel, Wegener, G. , *Pulping Processes in: Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, 1st ed. Berlin: Walter de Gruyter &Co, 1983.
- [35] D. Clayton, Einspahr, D., Easty, D., Lonsky, W., Malcolm, E., McDonough, T., Shroeder, L. ,Thompson, N., “Overview”, *em Pulp and Paper Manufactures* vol. 5: TAPPI e CPPA, Alkaline Pulping, T. Grace, B. Leopold, 1983.
- [36] Lisboa, S. A. B., Dissolução e precipitação de Xilanas durante o cozimento de Kraft de *E. Globulus*. (Tese de doutoramento) Departamento de Química Universidade de Aveiro, 2008.
- [37] Pinto, P. C. d. O. R., Influência da estrutura química dos componentes da madeira no seu desempenho nos processos de produção de pastas celulósicas. Estudo comparativo entre *Eucalyptus globulus* e outras folhosas, (Tese de doutoramento) Departamento de química, Universidade de Aveiro, 2008.
- [38] Carreira, H. J. M., Redução de grupos cromóforos responsáveis pela cor da pasta kraft, (Tese de mestrado) departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2008.
- [39] A.-B. M. R. Cabral J. M. S., Gama M., *Engenharia Enzimática* Lidel-Colecção Biotec, 2003.
- [40] J. R. Mariotto, "Estagio de docencia : Cinética enzimática," 2006.
- [41] A. L. Lehninger, *Componentes moleculares das células* vol. 1, 1917.
- [43] A. L. T. O. García, J. F. Colom, F. I. J. Pastor, P. Díaz , T. Vidal "Effect of cellulase - assisted refining on the properties of dried and never – dried eucalyptus pulp," Department of Textile and Paper Engineering, E. T. S. E. I. Terrassa Polytechnical University of Catalonia, Catalonia, 2002.
- [44] C. G. Nuno Gil, M. E. Amaral, A. P. Costa, A. P. Duarte, "Uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta Kraft Branqueada de *Eucalyptus*

Globulus," departamento de Ciência e Tecnologia do Papel, Universidade da Beira Interior.

- [45] F. Björkling, Erik, S. Kirk, O., Tibtech, 1991.
- [46] L. B. Kim B., Lee Y., Jin I., Chung C., Lee J., "Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* A-53. *Enzyme and Microbial Technology* " vol. 44, pp. 411-416 2009.
- [47] D. Ereno, *Álcool de Celulose*: Pesquisa Fapesp, 2007.
- [48] S. J. Hassuani, *Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash*/Suleiman José Hassuani, Manoel Regis Lima Verde Leal, Isaías de Carvalho Macedo – Piracicaba: PNUD-CTC, 2005.
- [49] D. Fengel, Wegener, G. , *Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. New York: Walter de Gruyter, Inc., 1989.
- [50] W. TM, *Fungal cellulases* vol. 20: Biochem. Soc. Transact, 1992.
- [51] R. G. H. S. E. T. Reese, H. S. Levinson, The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis, *J. Bacteriol.*, 1950.
- [52] T. M. W. K. E. Eriksson, "Wood, Biodegradation of cellulose, in Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components," (*T. Higuchi, ed.*) *Academic Press*, 1985.
- [53] N. S. David N. S. Hon, *Wood and cellulose chemistry* vol. 2, Marcel Dekker, 2001.
- [55] Pavarina, E. C. Pavarina, Estudo dos sistemas celulolíticos e fermentativo de fungos microaérobios facultativos, (Tese de mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, S.P., 1997.
- [56] Silva, T. A., Caracterização química de polpas Kraft recicladas obtidas por tratamento com oxigênio e sistema Lacase-HBT, (Tese de mestrado), Universidade Federal do Paraná, 2005.
- [57] N. F. G. Daniela, Diversidade e potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados do Manguezal barra das jangadas, Jabotão dos guararapes, Pernambuco, (Pós Graduação em Biologia de Fungos), Centro de Ciência Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil 2007.

- [58] Sousa, H. M. P. D., Aplicação de celulases e xilanases na reciclagem de fibras de papel,(Tese de doutoramento), Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2002.
- [59] C. A. Mooney, Mansfield, S. D., Beatson, R. P., Saddler, J. N. , *The effect of fibre characteristics on accessibility and hydrolysis of softwood substrates*. vol. C: 7th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, 1998.
- [60] A. Suurnäkki, Heijnesson, A., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Westermark, U, *Location of xylanase and mannanase action in Kraft fibres* vol. 22: J.of Pulp and Paper Science, 1996.
- [61] A. Suurnäkki, Heijnesson, A., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Westermark, U. , *Effect of pulp surfaces on enzyme-aided bleaching of Kraft Pulps*. vol. 22: J. of Pulp and Paper Science 1996.
- [62] D. J. Senior, Mayers, P. R., Breuil, C., Saddler, J. N., *The interaction of xylanase with pulps: non-selective adsorption and inactivation of xylanase. Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture - Applications and Fundamental Investigations*. . Boston: Butterworth-Heinemann, 1990.
- [63] F. Kaya, Heitmann Jr., J. A., Joyce, T. W., *Cellulase binding to cellulose fibers in high shear fields*. vol. 36: J. of Biotechnology, 1994.
- [64] J. Buchert, Tenkanen, M., Viikari, L., *Role of surface charge and swelling on the action of xylanses on birch Kraft pulp*. vol. 76: Tappi J., 1993.
- [65] M. S. Rahman, *Handbook of Preservation*. New York, 1998.
- [66] J. Welte-Chanes, Lopez-Malo, A., Palou, E., Bermudez, D., Guerrero-Beltran, J. A., Barbosa-Canovas, G. V., *Fundamentals and applications of high pressure processing to foods, in Novel Food Processing Technologies*. New York, 2005.
- [67] C. S. C. Nunes, Efeito do processamento nas características físico-químicas da Ameixa D'Elvas – Alterações ao Nível dos Polissacarídeos das Paredes celulares, Enzimas, Aroma e Textura, (Tese de doutoramento) Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2008.
- [68] M. Yaldagard, Mortazavi, S. A., Tabatabaie, F., *The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects*, vol. 7, pp. 2739-2767, 2008.

- [69] G. R. Quaglia G. B., Paperi R., Paoletti F. , *Effect of high pressure treatments on peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas*: Food Science and Technology, 1996.
- [70] D. G. L. Campos F. P., Cristianini M. , "*The use of high pressure technology in food processing*" Brazilian Journal of Food Technology, vol 153, 2003.
- [71] M. Hendrickx, *et al.*, "Effects of high pressure on enzymes related to food quality," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 9, pp. 197-203, 1998.
- [72] R. Buckow and V. Heinz, "High Pressure Processing – a Database of Kinetic Information," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 80, pp. 1081-1095, 2008.
- [73] L. Fang, *et al.*, "Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase," *Food Chemistry*, vol. 109, pp. 802-807, 2008.
- [74] D. Knorr, *Effects of high-hydrostatic-pressure processes and food safety and quality*. New Orleans: in Symp on Bifido-Bacteria – Old Concepts: New Food Products, at the 1992 Annual Meeting of the Inst of Food Technologists, 1992.
- [75] J. A. Guerrero-Beltran, Barbosa-Canovas, G., Swanson, B. G., "High hydrostatic pressure processing of fruit and vegetable products" *Food Reviews International*, vol. 21, pp.441-425, 2005.
- [76] R. Buckow, Heinz, V., Knorr, D. , "Effect of high hydrostatic pressure-temperature combinations on the activity of beta-glucanase from barley malt," vol. 111, pp. 282-289, 2005.
- [77] M. F. San Martin, Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., "Food processing by high hydrostatic pressure", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol 42 2002.
- [79] G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic Acid Reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry* pp. 426-428, 1959.
- [80] H. Sixta, *Pulp Properties and Applications*: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008.
- [81] T. Gorshkova, *et al.*, "Specific type of secondary cell wall formed by plant fibers," *Russian Journal of Plant Physiology*, volume. 57, pp. 328-341, 2010.

Anexo

Anexo A – Tabelas auxiliares

Nesta secção apresentam-se as tabelas obtidas no tratamento dos dados experimentais, bem como as tabelas com informação relevante para o tratamento dos resultados experimentais

Tabela A 1- Massas necessárias à determinação do teor de humidade relativa da pasta

Pasta	m_{copo} ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{copo+pasta}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	m_{pasta} ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{copo+pasta seca}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{pasta seca}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)
Seca ao ar	16,8523	17,8870	1,0347	17,8041	0,9518
	18,1535	19,4847	1,3312	19,3796	1,2261

Tabela A 2- Massas necessárias à determinação do teor de cinza relativa da pasta

Pasta	m_{cadinho} ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{cadinho+pasta}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	m_{pasta} ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{cadinho+cinza}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	m_{cinza} ($\pm 0,0001\text{g}$)
Seca ao ar	12,1097	13,1994	1,0897	12,1110	0,0013
	11,7691	12,8477	1,0786	11,7704	0,0013
	11,5608	12,5621	1,0013	11,5620	0,0012

Tabela A 3- Massas necessárias à determinação do teor de extractáveis em acetona relativa da pasta

Pasta	$m_{\text{balão+esferas}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	m_{cartucho} ($\pm 0,0001\text{g}$)	m_{pasta} ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{cartucho+pasta}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)	$m_{\text{balão seco+esferas}}$ ($\pm 0,0001\text{g}$)
Seca ao ar	165,3991	4,1308	1,8260	5,9568	165,4023
	164,8670	3,5348	2,3598	5,8946	164,8714

Para encontrar as condições da hidrólise da celulase, utilizou-se como substrato o CMC a 1% (wt), uma vez que as suas características já eram conhecidas. Nos ensaios demonstrados nas tabelas A.4 e A.5 utilizou-se um volume de CMC de 15 ml e uma concentração de enzima de 5,56 mg/ml.

Tabela A 4- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática do CMC (1%) usando a celulase de concentração de 5,56 mg/ml

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
5	0,012	0,020	0,000	0,001	0,002	0,017	0,823	7,409	0,165	1,482	4,116
10	0,012	0,018	0,000	0,001	0,002	0,013	0,823	5,763	0,082	0,576	3,293
20	0,021	0,022	0,002	0,002	0,019	0,021	8,232	9,056	0,412	0,453	8,644
30	0,034	0,036	0,004	0,004	0,044	0,048	18,935	20,581	0,631	0,686	19,758
60	0,044	0,045	0,005	0,005	0,063	0,065	27,167	27,990	0,453	0,467	27,579
90	0,047	0,049	0,006	0,006	0,069	0,073	29,637	31,283	0,329	0,348	30,460
120	0,055	0,063	0,007	0,008	0,084	0,100	36,223	42,809	0,302	0,357	39,516
165	0,115	0,126	0,017	0,018	0,199	0,220	85,618	94,673	0,519	0,574	90,145

Tabela A 5- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática do CMC (1%) usando a celulase de concentração de 5,56 mg/ml

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
30	0,027	0,028	0,002	0,003	0,030	0,032	12,760	13,584	0,425	0,453	13,172
45	0,038	0,042	0,004	0,005	0,051	0,058	21,816	25,109	0,485	0,558	23,462
60	0,051	0,050	0,006	0,006	0,076	0,074	32,518	31,695	0,542	0,528	32,107
90	0,054	0,053	0,007	0,007	0,081	0,079	34,988	34,165	0,389	0,380	34,576
120	0,056	0,055	0,007	0,007	0,085	0,083	36,634	35,811	0,305	0,298	36,223
150	0,059	0,060	0,008	0,008	0,091	0,093	39,104	39,927	0,261	0,266	39,516
165	0,061	0,062	0,008	0,008	0,096	0,097	41,162	41,574	0,249	0,252	41,368

Na tabela A.6 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, para este ensaio optou-se por uma $m_{\text{pasta}} = 0,5020\text{g}$ e com uma concentração de enzima de $5,56\text{ mg/ml}$

Tabela A 6- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de $5,56\text{ mg/ml}$

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
15	0,018	0,021	0,001	0,002	0,013	0,019	5,763	8,232	0,384	0,549	6,998
30	0,057	0,067	0,007	0,009	0,088	0,107	37,869	46,102	1,262	1,537	41,986
60	0,085	0,076	0,012	0,010	0,142	0,124	60,920	53,511	1,015	0,892	57,216
90	0,111	0,116	0,016	0,017	0,191	0,201	82,325	86,441	0,915	0,960	84,383
120	0,116	0,123	0,017	0,018	0,201	0,214	86,441	92,203	0,720	0,768	89,322

Como não se conseguiu alcançar o patamar nas condições apresentadas na tabela A.4, optou-se por reduzir a quantidade de pasta que foi sujeita ao tratamento enzimático mantendo a mesma concentração de enzima.

A tabela A.7 apresenta os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft ($0,2510\text{g}$)

Tabela A 7- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de $5,56\text{ mg/ml}$

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reactor1} (μmol)	n(Glc) _{reactor2} (μmol)	Act _{reactor1} (μmol/min)	Act _{reactor2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
15	0,020	0,019	0,001	0,001	0,015	0,013	0,856	0,755	0,057	0,050	0,806
30	0,036	0,036	0,004	0,004	0,043	0,043	2,468	2,468	0,082	0,082	2,468
60	0,044	0,046	0,005	0,006	0,058	0,061	3,273	3,475	0,055	0,058	3,374
90	0,060	0,059	0,008	0,008	0,086	0,084	4,885	4,784	0,054	0,053	4,834
120	0,075	0,073	0,010	0,010	0,112	0,109	6,395	6,194	0,053	0,052	6,295
150	0,116	0,116	0,017	0,017	0,185	0,185	10,525	10,525	0,070	0,070	10,525
180	0,118	0,116	0,017	0,017	0,189	0,185	10,726	10,525	0,060	0,058	10,625

Nos ensaios apresentados nas tabelas A.8, A.9, A.10 e A.11 optou-se por diminuir a quantidade de pasta sujeita à hidrólise para cerca de 0,040g e aumentar a concentração da enzima para 22,22 mg/ml, para alcançar o patamar, uma vez que nas condições dos ensaios realizados anteriormente ainda não teria sido possível.

Tabela A 8- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,092	0,091	0,013	0,013	0,143	0,141	6,328	6,249	0,844	0,833	6,289
10	0,115	0,115	0,017	0,017	0,183	0,183	8,136	8,136	0,814	0,814	8,136
15	0,118	0,117	0,017	0,017	0,189	0,187	8,372	8,293	0,558	0,553	8,332
30	0,167	0,165	0,025	0,024	0,275	0,272	12,223	12,066	0,407	0,402	12,145
60	0,218	0,213	0,033	0,032	0,366	0,357	16,232	15,839	0,271	0,264	16,036
90	0,236	0,231	0,036	0,035	0,397	0,389	17,647	17,254	0,196	0,192	17,451
120	0,257	0,252	0,039	0,038	0,435	0,426	19,298	18,905	0,161	0,158	19,101
150	0,273	0,268	0,042	0,041	0,463	0,454	20,556	20,163	0,137	0,134	20,359

Tabela A 9- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,080	0,077	0,011	0,010	0,121	0,116	5,385	5,149	0,718	0,686	5,267
10	0,090	0,089	0,013	0,012	0,139	0,137	6,171	6,092	0,617	0,609	6,131
15	0,105	0,100	0,015	0,014	0,166	0,157	7,350	6,957	0,490	0,464	7,153
30	0,131	0,129	0,019	0,019	0,212	0,208	9,393	9,236	0,313	0,308	9,315
60	0,176	0,175	0,026	0,026	0,291	0,289	12,931	12,852	0,216	0,214	12,891
90	0,193	0,190	0,029	0,028	0,321	0,316	14,267	14,031	0,159	0,156	14,149
120	0,219	0,216	0,033	0,033	0,367	0,362	16,311	16,075	0,136	0,134	16,193
150	0,246	0,243	0,037	0,037	0,415	0,410	18,433	18,197	0,123	0,121	18,315

Tabela A 10- 3ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,091	0,090	0,013	0,013	0,142	0,140	6,289	6,210	0,838	0,828	6,249
10	0,115	0,113	0,017	0,016	0,184	0,181	8,175	8,018	0,818	0,802	8,096
15	0,117	0,118	0,017	0,017	0,188	0,189	8,332	8,411	0,555	0,561	8,372
30	0,171	0,167	0,026	0,025	0,283	0,276	12,577	12,263	0,419	0,409	12,420
60	0,221	0,225	0,033	0,034	0,372	0,379	16,507	16,822	0,275	0,280	16,665
90	0,239	0,230	0,036	0,035	0,404	0,388	17,922	17,215	0,199	0,191	17,569
120	0,258	0,255	0,039	0,039	0,437	0,432	19,416	19,180	0,162	0,160	19,298
150	0,276	0,268	0,042	0,041	0,469	0,455	20,831	20,202	0,139	0,135	20,516

Tabela A 11- 4ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,079	0,078	0,011	0,011	0,120	0,119	5,345	5,267	0,713	0,702	5,306
10	0,092	0,090	0,013	0,013	0,143	0,140	6,367	6,210	0,637	0,621	6,289
15	0,104	0,103	0,015	0,015	0,165	0,163	7,310	7,232	0,487	0,482	7,271
30	0,132	0,129	0,019	0,019	0,214	0,209	9,511	9,276	0,317	0,309	9,393
60	0,183	0,180	0,027	0,027	0,304	0,299	13,520	13,285	0,225	0,221	13,402
90	0,204	0,205	0,031	0,031	0,342	0,343	15,171	15,250	0,169	0,169	15,210
120	0,220	0,218	0,033	0,033	0,370	0,366	16,429	16,272	0,137	0,136	16,350
150	0,239	0,240	0,036	0,037	0,404	0,405	17,922	18,001	0,119	0,120	17,962

Nas tabelas A.12 e A.13 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 15 minutos e sobre o efeito de 300 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 12- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 15 minutos e para a pressão de 300 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,094	0,093	0,013	0,013	0,147	0,145	6,524	6,446	0,870	0,859	6,485
10	0,101	0,102	0,014	0,015	0,159	0,161	7,075	7,153	0,707	0,715	7,114
15	0,125	0,122	0,018	0,018	0,202	0,196	8,961	8,725	0,597	0,582	8,843
30	0,150	0,150	0,022	0,022	0,246	0,246	10,926	10,926	0,364	0,364	10,926
60	0,259	0,258	0,040	0,039	0,439	0,437	19,494	19,416	0,325	0,324	19,455
90	0,262	0,269	0,040	0,041	0,444	0,457	19,730	20,281	0,219	0,225	20,005
120	0,275	0,282	0,042	0,043	0,467	0,480	20,752	21,302	0,173	0,178	21,027
150	0,283	0,285	0,043	0,044	0,482	0,485	21,381	21,538	0,143	0,144	21,460

Tabela A 13- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 15 minutos e para a pressão de 300 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,089	0,088	0,012	0,012	0,138	0,136	6,131	6,053	0,818	0,807	6,092
10	0,094	0,092	0,013	0,013	0,147	0,143	6,524	6,367	0,652	0,637	6,446
15	0,114	0,113	0,016	0,016	0,182	0,181	8,096	8,018	0,540	0,535	8,057
30	0,146	0,144	0,022	0,021	0,239	0,235	10,612	10,455	0,354	0,348	10,533
60	0,185	0,182	0,028	0,027	0,308	0,303	13,678	13,442	0,228	0,224	13,560
90	0,239	0,237	0,036	0,036	0,404	0,400	17,922	17,765	0,199	0,197	17,844
120	0,260	0,256	0,040	0,039	0,441	0,434	19,573	19,259	0,163	0,160	19,416
150	0,280	0,277	0,043	0,042	0,476	0,471	21,145	20,909	0,141	0,139	21,027

Nas tabelas A.14 e A.15 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 45 minutos e sobre o efeito de 300 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 14- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 45 minutos e para a pressão de 300 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,094	0,093	0,013	0,013	0,147	0,145	6,524	6,446	0,870	0,859	6,485
10	0,119	0,119	0,017	0,017	0,191	0,191	8,490	8,490	0,849	0,849	8,490
15	0,123	0,121	0,018	0,018	0,198	0,195	8,804	8,647	0,587	0,576	8,725
30	0,200	0,196	0,030	0,030	0,335	0,327	14,857	14,542	0,495	0,485	14,699
60	0,227	0,223	0,034	0,034	0,382	0,375	16,979	16,665	0,283	0,278	16,822
90	0,268	0,272	0,041	0,042	0,455	0,462	20,202	20,516	0,224	0,228	20,359
120	0,326	0,327	0,050	0,050	0,558	0,559	24,761	24,840	0,206	0,207	24,800
150	0,328	0,328	0,051	0,051	0,561	0,561	24,918	24,918	0,166	0,166	24,918

Tabela A 15- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 45 minutos e para a pressão de 300 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,103	0,099	0,015	0,014	0,163	0,156	7,232	6,917	0,964	0,922	7,075
10	0,132	0,129	0,019	0,019	0,214	0,209	9,511	9,276	0,951	0,928	9,393
15	0,153	0,151	0,023	0,022	0,251	0,248	11,162	11,005	0,744	0,734	11,084
30	0,184	0,190	0,028	0,029	0,306	0,317	13,599	14,071	0,453	0,469	13,835
60	0,270	0,270	0,041	0,041	0,458	0,458	20,359	20,359	0,339	0,339	20,359
90	0,308	0,307	0,047	0,047	0,526	0,524	23,346	23,268	0,259	0,259	23,307
120	0,325	0,335	0,050	0,052	0,556	0,574	24,682	25,469	0,206	0,212	25,076
150	0,339	0,350	0,052	0,054	0,581	0,600	25,783	26,648	0,172	0,178	26,215

Nas tabelas A.16 e A.17 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 5 minutos e sobre o efeito de 400 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 16- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 5 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,128	0,127	0,019	0,018	0,207	0,205	9,197	9,118	1,226	1,216	9,158
10	0,142	0,142	0,021	0,021	0,232	0,232	10,297	10,297	1,030	1,030	10,297
15	0,146	0,146	0,022	0,022	0,239	0,239	10,612	10,612	0,707	0,707	10,612
30	0,245	0,244	0,037	0,037	0,414	0,412	18,394	18,315	0,613	0,611	18,355
60	0,301	0,301	0,046	0,046	0,513	0,513	22,796	22,796	0,380	0,380	22,796
90	0,179	0,166	0,027	0,025	0,297	0,274	26,412	24,368	0,293	0,271	25,390
120	0,199	0,197	0,030	0,030	0,333	0,329	29,556	29,242	0,246	0,244	29,399
150	0,208	0,201	0,031	0,030	0,349	0,336	30,971	29,871	0,206	0,199	30,421

Tabela A 17- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 5 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,114	0,114	0,016	0,016	0,181	0,181	8,057	8,057	1,074	1,074	8,057
10	0,134	0,131	0,020	0,019	0,217	0,212	9,629	9,393	0,963	0,939	9,511
15	0,169	0,164	0,025	0,024	0,279	0,270	12,381	11,988	0,825	0,799	12,184
30	0,207	0,207	0,031	0,031	0,346	0,346	15,368	15,368	0,512	0,512	15,368
60	0,264	0,259	0,040	0,039	0,447	0,438	19,848	19,455	0,331	0,324	19,652
90	0,160	0,155	0,024	0,023	0,263	0,254	23,346	22,560	0,259	0,251	22,953
120	0,169	0,165	0,025	0,024	0,279	0,272	24,761	24,132	0,206	0,201	24,447
150	0,183	0,184	0,027	0,028	0,304	0,305	26,962	27,119	0,180	0,181	27,041

Nas tabelas A.18 e A.19 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 15 minutos e sobre o efeito de 400 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 18- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 15 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,129	0,126	0,019	0,018	0,209	0,204	9,276	9,040	1,237	1,205	9,158
10	0,148	0,148	0,022	0,022	0,243	0,243	10,769	10,769	1,077	1,077	10,769
15	0,169	0,168	0,025	0,025	0,280	0,278	12,420	12,341	0,828	0,823	12,381
30	0,245	0,246	0,037	0,037	0,414	0,416	18,394	18,473	0,613	0,616	18,433
60	0,330	0,330	0,051	0,051	0,565	0,565	25,076	25,076	0,418	0,418	25,076
90	0,380	0,371	0,059	0,057	0,653	0,637	29,006	28,298	0,322	0,314	28,652
120	0,203	0,204	0,031	0,031	0,340	0,342	30,185	30,342	0,252	0,253	30,264
150	0,204	0,205	0,031	0,031	0,342	0,343	30,342	30,499	0,202	0,203	30,421

Tabela A 19- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 15 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,139	0,139	0,020	0,020	0,226	0,226	10,022	10,022	1,336	1,336	10,022
10	0,141	0,140	0,021	0,020	0,229	0,227	10,180	10,101	1,018	1,010	10,140
15	0,207	0,207	0,031	0,031	0,346	0,346	15,368	15,368	1,025	1,025	15,368
30	0,248	0,247	0,038	0,038	0,419	0,417	18,590	18,512	0,620	0,617	18,551
60	0,309	0,310	0,047	0,048	0,527	0,528	23,385	23,464	0,390	0,391	23,425
90	0,185	0,185	0,028	0,028	0,307	0,307	27,277	27,277	0,303	0,303	27,277
120	0,190	0,190	0,028	0,028	0,316	0,316	28,063	28,063	0,234	0,234	28,063
150	0,191	0,189	0,029	0,028	0,318	0,314	28,220	27,905	0,188	0,186	28,063

Nas tabelas A.20 e A.21 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 45 minutos e sobre o efeito de 400 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 20- 1ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 45 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/ml

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,152	0,152	0,022	0,022	0,250	0,250	11,084	11,084	1,478	1,478	11,084
10	0,177	0,173	0,026	0,026	0,294	0,287	13,049	12,734	1,305	1,273	12,891
15	0,205	0,203	0,031	0,031	0,343	0,340	15,250	15,092	1,017	1,006	15,171
30	0,274	0,275	0,042	0,042	0,466	0,467	20,674	20,752	0,689	0,692	20,713
60	0,178	0,175	0,027	0,026	0,296	0,290	26,255	25,783	0,438	0,430	26,019
90	0,208	0,208	0,031	0,031	0,349	0,349	30,971	30,971	0,344	0,344	30,971
120	0,212	0,211	0,032	0,032	0,356	0,354	31,600	31,443	0,263	0,262	31,521
150	0,228	0,226	0,035	0,034	0,384	0,381	34,115	33,801	0,227	0,225	33,958

Tabela A 21- 2ª réplica dos valores obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática ml da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 45 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a celulase de concentração de 22,22 mg/

t (min)	Abs _{1eg}	Abs _{2eg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,147	0,151	0,022	0,022	0,241	0,248	10,691	11,005	1,425	1,467	10,848
10	0,167	0,160	0,025	0,024	0,276	0,264	12,263	11,712	1,226	1,171	11,988
15	0,187	0,185	0,028	0,028	0,312	0,308	13,835	13,678	0,922	0,912	13,756
30	0,249	0,249	0,038	0,038	0,421	0,421	18,708	18,708	0,624	0,624	18,708
60	0,169	0,168	0,025	0,025	0,280	0,278	24,840	24,682	0,414	0,411	24,761
90	0,171	0,173	0,026	0,026	0,283	0,287	25,154	25,469	0,279	0,283	25,311
120	0,204	0,203	0,031	0,031	0,342	0,340	30,342	30,185	0,253	0,252	30,264
150	0,205	0,208	0,031	0,031	0,343	0,349	30,499	30,971	0,203	0,206	30,735

Na tabela A.22 apresentam-se os resultados obtidos no tratamento enzimático da pasta kraft com a combinação da xilanase e com celulase, sendo esta sujeita previamente a um tratamento de alta pressão durante 15 minutos e sobre o efeito de 400 MPa. As condições de hidrólise são as mesmas apresentadas nos ensaios anteriores onde já foi possível obter o patamar.

Tabela A 22- Resultados obtidos para a quantificação do produto formado na hidrólise enzimática da pasta kraft *Eucalyptus globulus* sendo esta tratada a alta pressão durante um período de 15 minutos e para a pressão de 400 MPa usando a combinação de celulase com a xilanase

t (min)	Abs _{1cg}	Abs _{2cg}	[Glc] _{final1} (mg/ml)	[Glc] _{final2} (mg/ml)	m(Glc) _{tubos1} (mg)	m(Glc) _{tubos2} (mg)	n(Glc) _{reator1} (μmol)	n(Glc) _{reator2} (μmol)	Act _{reator1} (μmol/min)	Act _{reator2} (μmol/min)	média _{Glc} (μmol)
7,5	0,119	0,119	0,017	0,017	0,190	0,190	8,450	8,450	1,127	1,127	8,450
10	0,138	0,140	0,020	0,020	0,224	0,227	9,944	10,101	0,994	1,010	10,022
15	0,166	0,165	0,025	0,024	0,273	0,272	12,145	12,066	0,810	0,804	12,105
30	0,238	0,242	0,036	0,037	0,401	0,408	17,804	18,119	0,593	0,604	17,962
60	0,268	0,260	0,041	0,040	0,454	0,440	20,163	19,534	0,336	0,326	19,848

Anexo B – Gráficos auxiliares

Nesta secção apresentam-se os gráficos obtidos com informação relevante para o tratamento dos resultados experimentais.

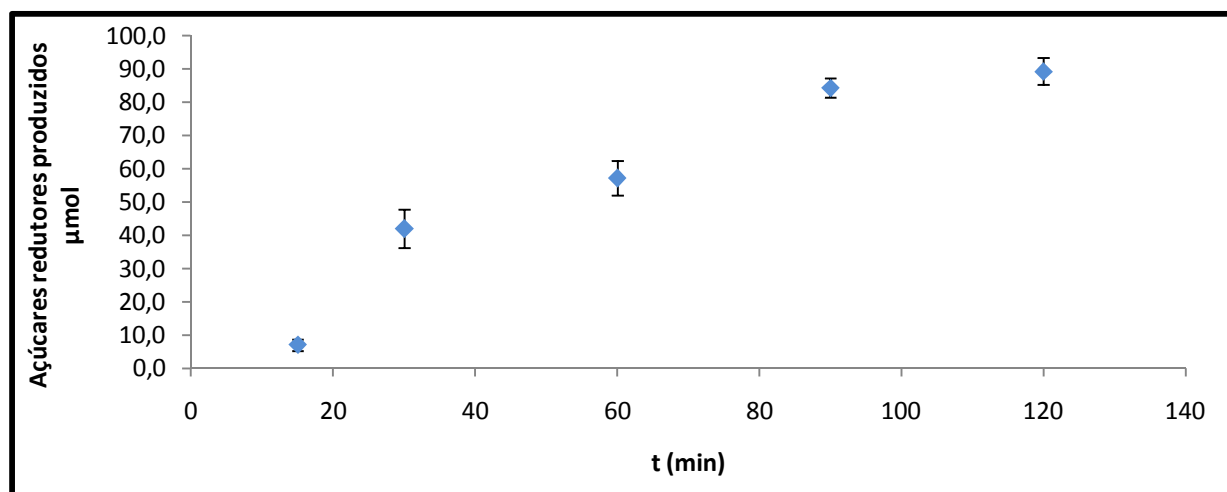


Figura B 1- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática de CMC, correspondente aos resultados da Tabela A.4.

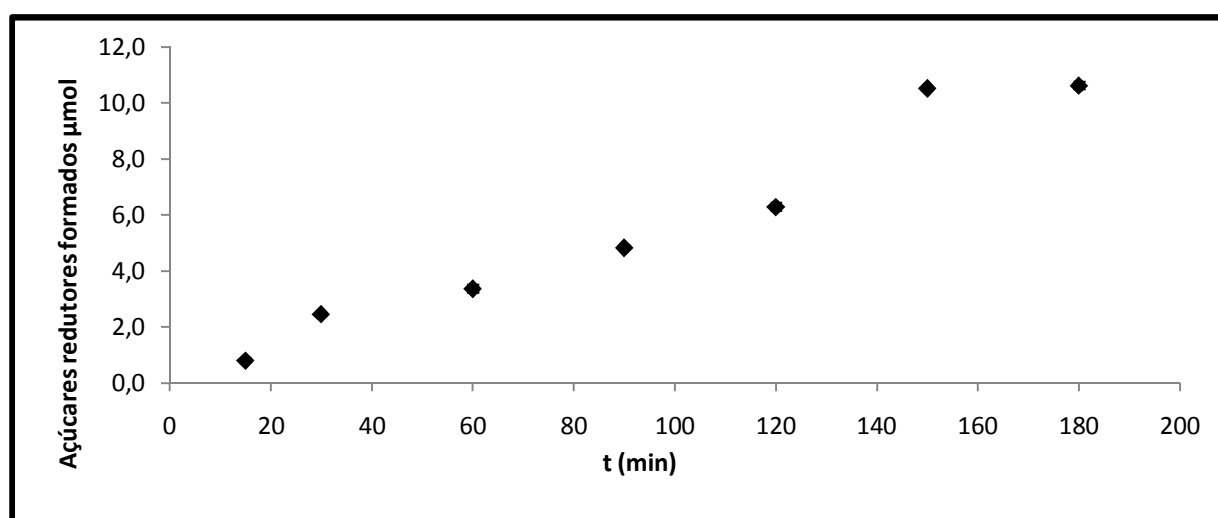


Figura B 2- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados da Tabela A.7.

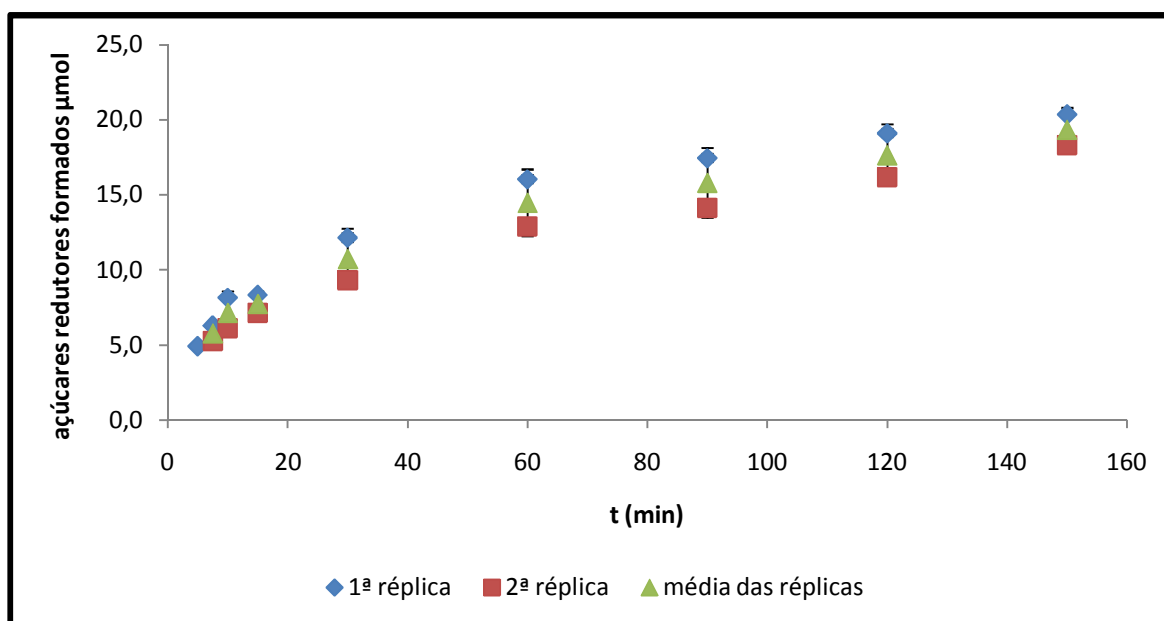


Figura B 3- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.8 e A.9.

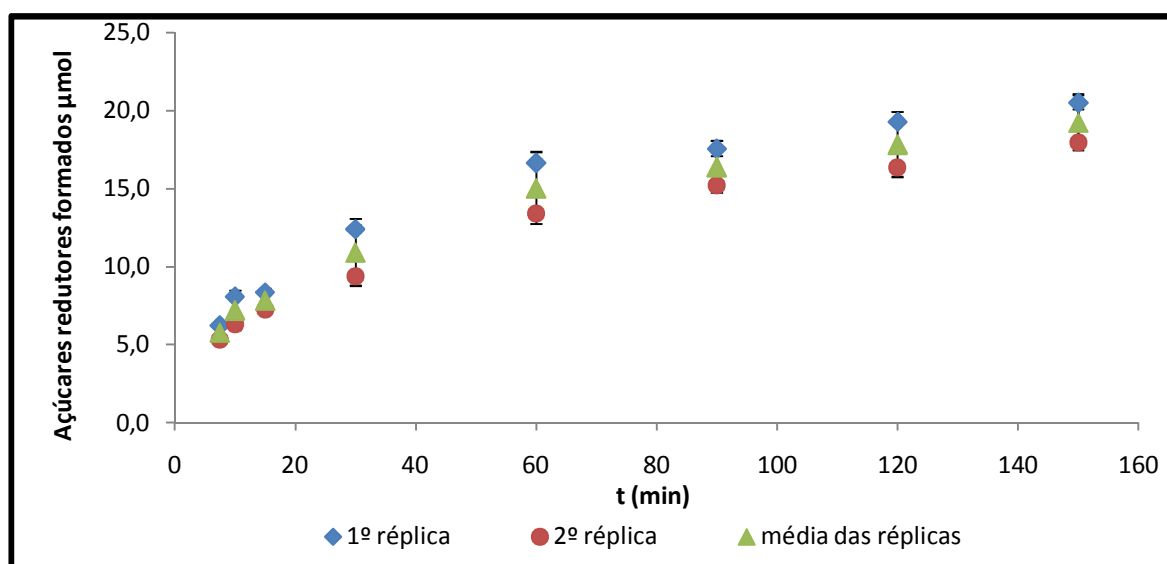


Figura B 4- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.10 e A.11.

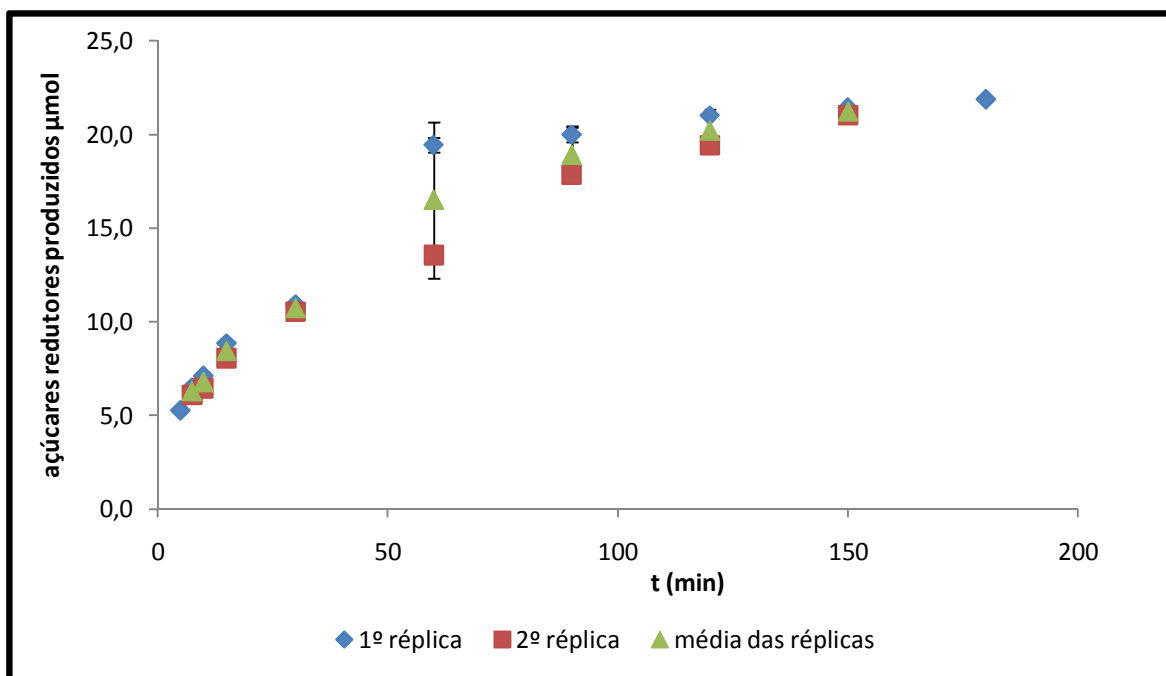


Figura B 5- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.12 e A.13.

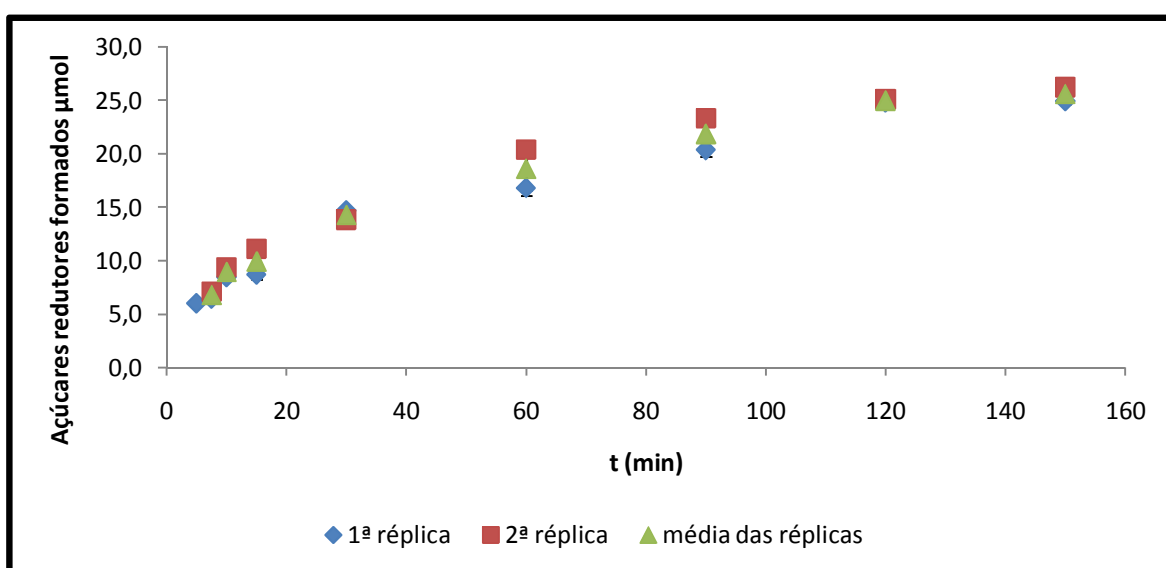


Figura B 6- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.14 e A.15.

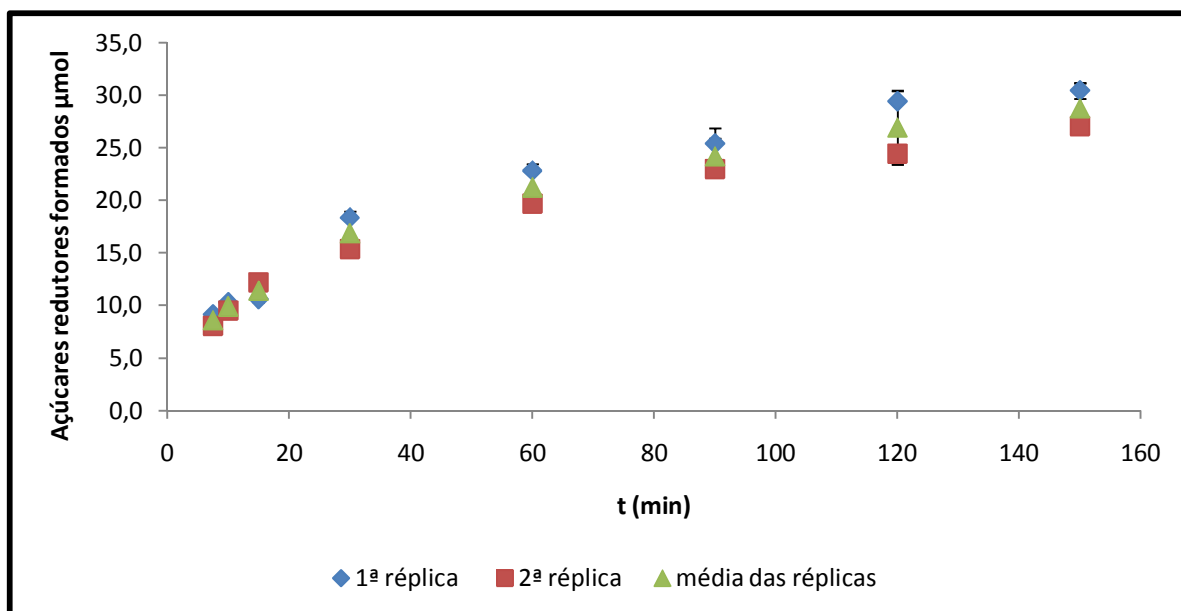


Figura B 7- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.16 e A.17.

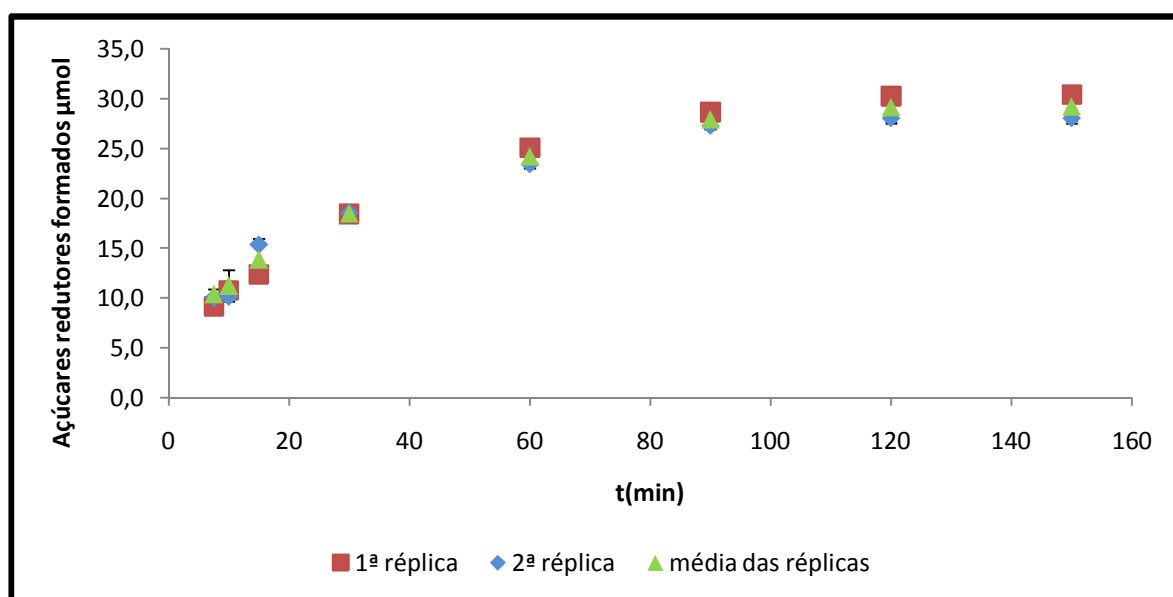


Figura B 8- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.18 e A.19.

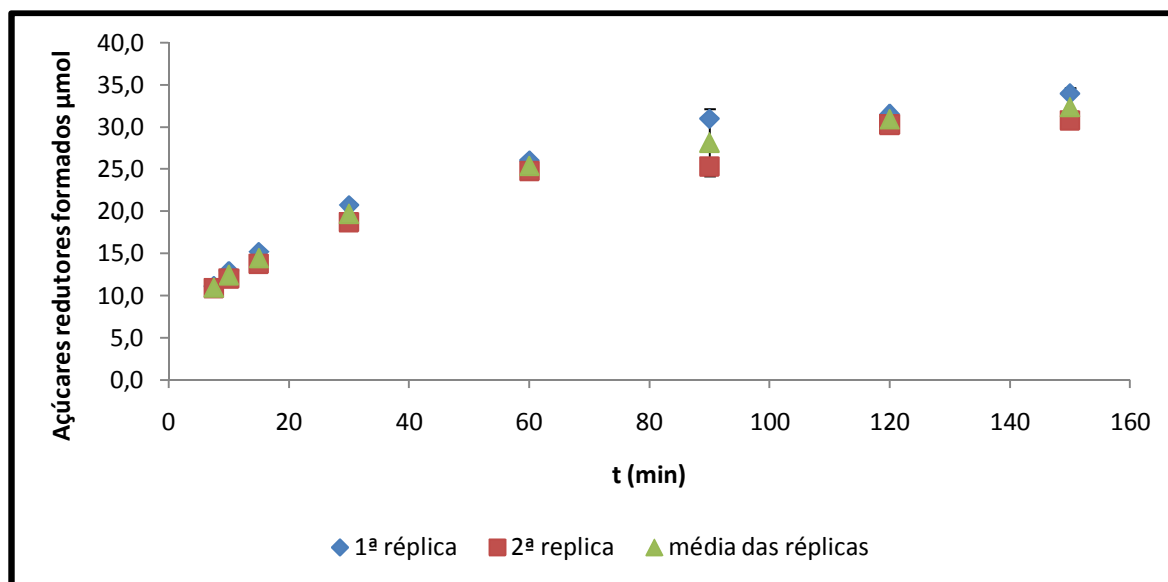


Figura B 9- Açúcares redutores formados ao longo do tempo da reacção enzimática da pasta kraf, correspondentes aos resultados das Tabela A.20 e A.21.

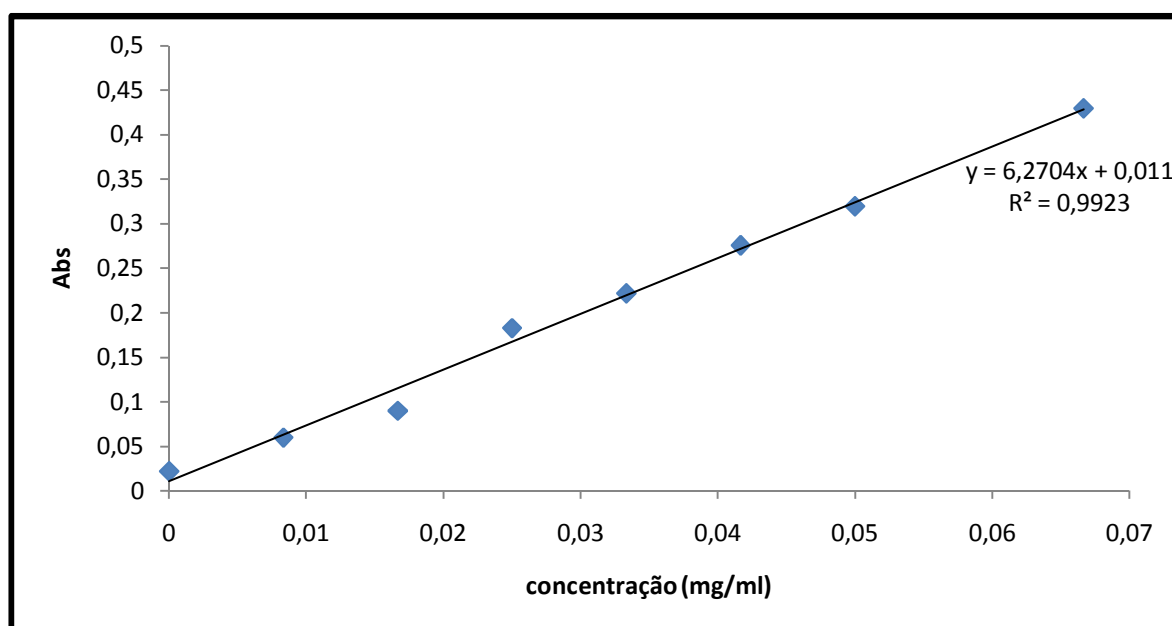


Figura B 10- Curva de calibração da glucose.

Anexo C – Metodologia de tratamento dos resultados experimentais

Nesta secção apresenta-se a linha de raciocínio, ou seja, a metodologia de tratamento dos dados experimentais, para as absorvâncias que são lidas após reacção de hidrólise, pois é necessário converter esse valor para que se consiga determinar a quantidade de açúcares redutores presentes no reactor onde decorreu a reacção de hidrólise.

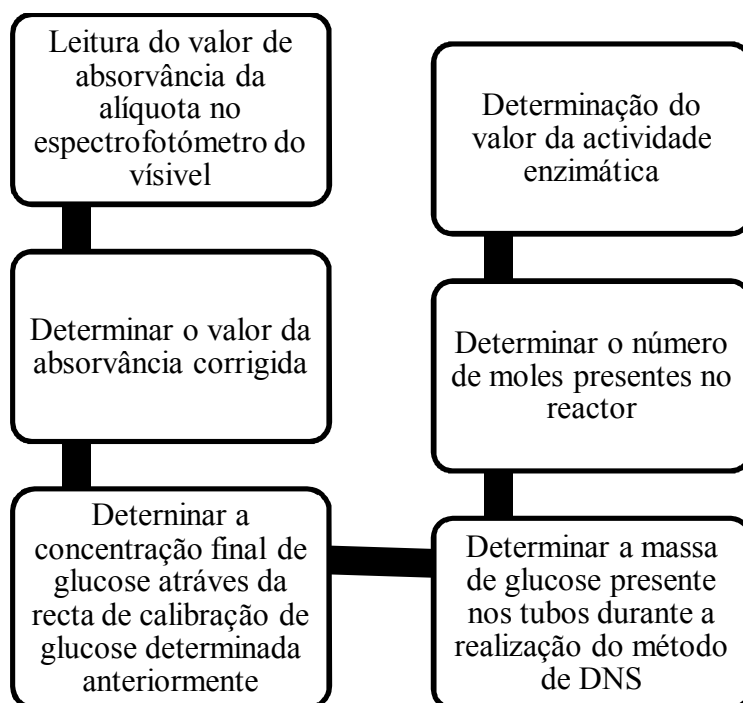


Figura C 1- Representação da metodologia de cálculo

1-Determinação do valor de absorvância corrigida (Abs_{cg}).

$$Abs_{cg} = Abs(t = t_r) - Abs(t = 0)$$

(C.1)

2-Determinação da concentração final de glucose ($[Glc]_{final}$) através da equação da recta de calibração de glucose para cada valor de absorvância.

$$[\text{Glc}]_{\text{final}}(\text{mg/ml}) = \frac{\text{Abs}_{\text{cg}} - b}{m}$$

(C.2)

3-Determinação da massa de glucose $[m(\text{Glc})_{\text{tubos}}]$ presente nos tubos durante a realização do método de DNS.

$$m(\text{Glc})_{\text{tubos}}(\text{mg}) = [\text{Glc}]_{\text{final}} \times (V_{\text{aliquota retirada do reactor}} + V_{\text{DNS}} + V_{\text{H}_2\text{O}})$$

(C.3)

4-Determinação do número de moles de glucose $(n(\text{Glc})_{\text{reactor}})$ presentes no reactor.

$$m(\text{Glc})_{\text{reactor}}(\text{mg}) = \frac{m(\text{Glc})_{\text{tubos}} \times V_{\text{aliquota retirada do reactor}}}{V_{\text{tubo}}} \times (V_{\text{tampão}} + V_{\text{enzima}})$$

(C.4)

$$n(\text{Glc})_{\text{reactor}}(\mu\text{mol}) = \frac{m(\text{Glc})_{\text{reactor}} \times 10^{-3}}{M(\text{Glc})} \times 10^6$$

(C.5)

5-Determinação do valor da actividade enzimática (Act)

$$\text{Act}(\mu\text{mol/min}) = \frac{n(\text{Glc})_{\text{reactor}}}{t_r}$$

(C.6)